Untersuchung über die Einwirkung cancerogener Nitrosamine und ultravioletter Strahlung auf Nukleinsäurebestandteile

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Rolf Kleber
aus Würzburg

Würzburg 1966

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544722_0035

Untersuchung über die Einwirkung cancerogener Nitrosamine und ultravioletter Strahlung auf Nukleinsäurebestandteile

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Rolf Kleber
aus Würzburg

Würzburg 1966

Eingereicht am: 24. Oktober 1966

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 1966

Berichterstatter: Prof. Dr. E.FAHR

Mitberichterstatter: Prof. Dr. S.HÜNIG

Promotion 25. Jan. 1967

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. E. FAHR, danke ich für die großzügige Unterstützung, sein stetes Wohlwollen und die vielfältigen Anregungen im Verlauf meiner Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

I. Allgemeiner Teil — Seite

Teil A der Arbeit:

1. Einleitung 1
2. Die Einwirkung von Nitrosaminen auf Nukleinsäure-Bestandteile 6
3. Die Einwirkung von Nitrosaminen auf Harnstoff und symm. Dimethyl-harnstoff 14
4. Die Überprüfung der Reaktionsmöglichkeiten von cancerogenen Nitrosaminen mit Nukleinsäure-Bestandteilen 16

Teil B der Arbeit:

1. Einleitung 35
2. Das Verhalten von Cytosin beim Bestrahlen mit UV-Strahlung in wässriger Lösung 38
3. Versuche zur chemischen Synthese des reversiblen Bestrahlungsproduktes des Cytosins . 44
4. Das Verhalten von Cytidin beim Bestrahlen in wässriger Lösung 46
5. Versuche zur chemischen Synthese des reversiblen Bestrahlungsproduktes des Cytidins . 49
6. Das Verhalten der Cytidylsäure beim Bestrahlen in wässriger Lösung 51
7. Darstellung des reversiblen Bestrahlungsproduktes der Cytidylsäure 56

Seite

8. Untersuchung der bei der UV-Bestrahlung von Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure anfallenden Nebenprodukte 60

9. Die UV-Bestrahlung von weiteren Nukleinsäure-Bestandteilen in wässriger Lösung 62

10. Die UV-Bestrahlung von Cytosin, Cytidin, Cytidylsäure und von anderen Pyrimidinen in gefrorener wässriger Lösung 66

11. Die UV-Bestrahlung von Purin-Bestandteilen in wässriger Lösung 68

12. Bestimmung der Quantenausbeute 70

Zusammenfassung 73

II. Experimenteller Teil

Teil A der Arbeit:

1. Allgemeine Methoden 75

2. Die Umsetzung von Pyrimidin-Bestandteilen mit Nitrosaminen 77

3. Die Umsetzung von Pyrimidin-Bestandteilen mit salpetriger Säure 82

4. Die Überprüfung der Reaktionsmöglichkeiten von cancerogenen Nitrosaminen mit Nukleinsäure-Bestandteilen 85

Seite

Teil B der Arbeit:

1. Bestrahlungsmethoden 94
2. Die UV-Bestrahlung von Cytosin 96
3. Die UV-Bestrahlung von Cytidin 101
4. Die UV-Bestrahlung der Cytidylsäure 105
5. Darstellung des reversiblen Bestrahlungsproduktes der Cytidylsäure 116
6. Die UV-Bestrahlung von Thymin und Thymidin in wässriger Lösung 118
7. Die UV-Bestrahlung von Purin-Bestandteilen . . . 124

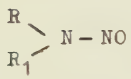
III. Literaturverzeichnis 126

I. ALLGEMEINER TEIL

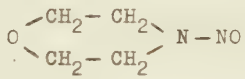
A) Untersuchung über die Einwirkung cancerogener Nitrosamine auf Nukleinsäurebestandteile.

1. Einleitung.

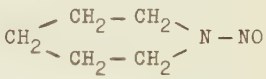
Seit mehreren Jahrzehnten ist bekannt, daß bestimmte chemische Substanzen wie hochkondensierte aromatische Kohlenwasserstoffe (Benzpyren, Chrysen), aromatische Amine (β-Naphthylamin, Anilin) sicher als cancerogen anzusehen sind. Durch umfangreiche Tierversuche konnte in den letzten 10 Jahren gezeigt werden, daß auch Nitrosamine der Struktur (1a) bis (1g) sowie N-Nitroso-morpholin (2) und N-Nitroso-piperidin (3) cancerogen sind (Lit. 1-3).



(1)



(2)



(3)

a: $R=R_1= CH_3-$

b: $R=R_1= C_2H_5-$

c: $R=R_1= CH_3-CH_2-CH_2-$

d: $R=R_1= CH_3-(CH_2)_3-$

e: $R=R_1= CH_3-(CH_2)_4-$

f: $R= CH_3-$; $R_1= CH_2=CH-$

g: $R= CH_3-$; $R_1= CH_3-(CH_2)_5-$

h: $R=R_1= p\text{-}CH_3-C_6H_4-$

i: $R= CH_3-$; $R_1= (CH_3)_3C-$

j: $R= CH_3-$; $R_1= C_6H_5-$

k: $R=R_1= (CH_3)_3C-$

Dagegen erwiesen sich Di-tolyl- (1h), Methyl-t-butyl- (1i), Methyl-phenyl- (1j) und Di-t-butyl-nitrosamin (1k) im Tier-

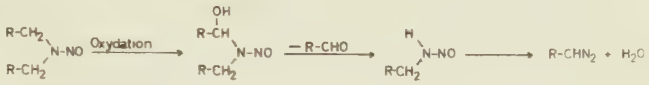
versuch als nicht cancerogen. In Tabelle 1 ist angegeben worden, welche Wirkung die am stärksten cancerogenen Nitrosamine (1a) und (1b) im Tierversuch an Ratten zeigen.

Tabelle 1: Übersicht über die cancerogenen Wirkungen, die Dimethyl-nitrosamin (1a) und Diäthyl-nitrosamin (1b) im Tierversuch zeigen (nach Lit. 4).

d=Größe der Einzeldosis, t=Dauer der Applikation;

	Applikationsart	Dosis	Krebsart
Dimethyl-nitrosamin	oral	d=niedrig t=lang	Lebercarcinome
	oral	d=hoch t=lang	anaplastische Nierentumore, Nieren- und Lungencarcinome
Diäthyl-nitrosamin	oral	d=niedrig t=lang	Lebercarcinome Oesophaguscarcinome
	oral	d=hoch t=kurz	Nierenadenome, Nierencarcinome, Leberadenome, Oesophaguscarcinome
	intravenös	d=niedrig t=lang	Lebercarcinome
	intravenös	d=hoch t=kurz	Lungen-, Nieren-, Ovarialcarcinome

Der erste Versuch, die cancerogenen Wirkungen der Nitrosamine (1) bis (3) chemisch zu deuten, wurde von D.F.HEATH 1961 (Lit. 5) unternommen.



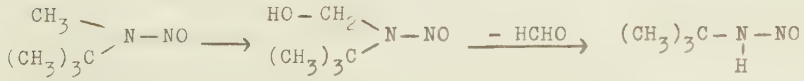
(4) (5) (6)

Er vermutete eine primäre Oxydation des Nitrosamins durch ein Enzym zum Hydroxy-nitrosamin (4), das unter Abspaltung des Aldehyds R-CHO (z.B. Formaldehyd) in das Alkyl-nitrosamin (5) übergeht. (5) soll dann das entsprechende Diazoalkan (6) bilden, das nun vom Autor als das eigentlich wirksame cancerogene Agens angesehen wird.

Als Belege für seine Annahme gibt der Autor folgende experimentelle Befunde an:

1) Das Di-t-butyl-nitrosamin und Diphenyl-nitrosamin, die nicht entsprechend dem obigen Mechanismus oxydiert werden können, erwiesen sich als nicht cancerogen.

2) Das Methyl-t-butyl-nitrosamin ist nicht cancerogen. Es kann zwar entsprechend der Theorie in α- Stellung zu (7) oxydiert werden; die Formaldehyd-Abspaltung führt jedoch zum Nitrosamin (8), das nicht mehr in ein Diazoalkan übergehen kann. Das Methyl-n-butyl-nitrosamin (1g) ist dagegen, wie nach dieser Theorie zu erwarten, cancerogen.



(7) (8)

Eine gewisse Stütze erhielt 1962 der von HEATH diskutierte Mechanismus durch Untersuchungen von P.N.MAGEE und E.FARBER (Lit. 6), die in vitro zeigen konnten, daß die C^{14}-markierte Methylgruppe von Dimethyl-nitrosamin als Methylgruppe im 7-Methyl-guanin der Nukleinsäuren der Leber nachgewiesen werden kann. Eine biochemisch einwandfreie Deutung der Übertragung der Methylgruppe wurde von den Autoren nicht gegeben.

Chemisch[1)] erscheint der von HEATH vorgeschlagene Mechanismus aus folgenden Gründen bedenklich:

1) Es gelang bis jetzt nicht ein Enzym nachzuweisen, das die Oxydation des Nitrosamins in das Hydroxy-nitrosamin bewirkt.

2) Es ist bis jetzt nicht bewiesen, daß Hydroxy-nitrosamine der Struktur (4) in die primären Nitrosamine und Aldehyde zerfallen können.

3) Von DRUCKREY und Mitarbeitern ist angenommen worden, daß das Monoalkyl-nitrosamin in das entsprechende Diazoalkan und Wasser zerfällt. Die Autoren berufen sich bei dieser Annahme auf eine Untersuchung von E.MÜLLER (Lit. 7), der das Methyl-nitrosamin durch Umsetzen von Methylamin mit Nitrosylchlorid bei -80° in Äther als Lösungsmittel nachweisen konnte. Es zerfällt unter diesen Bedingungen in Diazomethan und Wasser. Jedoch liegen hier nicht mit den biologischen Systemen vergleichbare Reaktionsbedingungen (aprotisches Lösungsmittel, -80° auf der einen, verdünnte wässrige Lösungen, Temperaturen um $+30^{\circ}$ auf der anderen Seite) vor. Bisher gibt es keinen gesicherten Befund, daß primäre Nitrosamine bei Raumtemperatur und in wässriger Lösung Diazoalkane bilden können. Die über das primäre Nitrosamin ablaufende Nitrosierung eines primären Amins in wässriger Lösung

führt - vermutlich über Carboniumionen als Zwischenstoff - unmittelbar zum Alkohol.

4) Die relativ große chemische Reaktivität der Nitrosamine läßt vermuten, daß diese in der Zelle nicht - wie bisher vermutet - " Objekt chemischer Reaktionen sind ", sondern ihrerseits durch ihre reaktive Nitrosogruppe chemische Reaktionen (Oxydationen, Nitrosierungen) auslösen.

Wir haben deshalb im ersten Teil der vorliegenden Arbeit geprüft, wie sich die cancerogenen Nitrosamine unter in der Zelle vorliegenden Bedingungen gegenüber den Pyrimidin- und Purin-Bestandteilen der Nukleinsäuren verhalten.

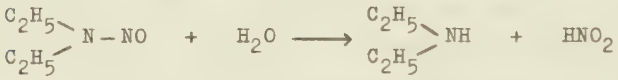
---

1) Auch aus medizinischen Gründen wurden in neuester Zeit an dem von HEATH vorgeschlagenen Mechanismus Zweifel geäußert (s. Lit. 1).

2. Die Einwirkung von Nitrosaminen auf Nukleinsäure-Bestandteile.

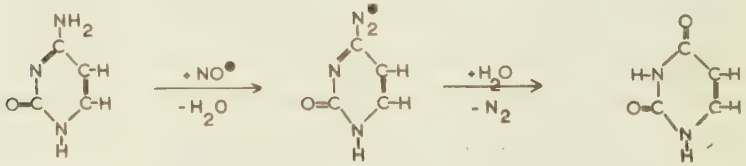
2.1. Die Umsetzung von Dimethyl-nitrosamin mit Cytosin, Cytidin und Cytidin-2'(3')-phosphorsäure.

Von A.GEUTHER (Lit. 8) ist bereits im Jahre 1863 beobachtet worden, daß Diäthyl-nitrosamin in wässriger Lösung beim Ansäuern in der Wärme in Diäthylamin (9) und salpetrige Säure gespalten wird.



(9)

Es lag deshalb nahe, anzunehmen, daß in wässriger Lösung bei Raumtemperatur die cancerogenen Nitrosamine bei der Einwirkung von Säure in das Amin und salpetrige Säure (oder andere nitrosierende Teilchen) gespalten werden, die dann im biologischen System freie NH_2-Gruppen desaminiert. Zum Beispiel ist eine Desaminierung der in der Desoxyribonukleinsäure vorkommenden Cytidylsäure denkbar.



(10)

Primär ist dabei die Bildung eines Diazo-pyrimidins der Struktur (10) zu erwarten, das jedoch sicherlich weiterzerfällt. So zersetzt sich das 5-Diazo-uracil in saurem Medium spontan unter Stickstoffentwicklung (Lit. 9; 10).

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden wässrige Lösungen von Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure mit Dimethyl-nitrosamin versetzt, auf ein bestimmtes pH (4.2 und 3.0) gebracht und längere Zeit bei einer Reaktionstemperatur von 30° stehen gelassen (Versuch 1 bis 3). In bestimmten Zeitintervallen wurden aus diesen Proben mit einer Pipette abgemessene Volumina entnommen und papierchromatographiert. Der so erhaltene Fleck des eingesetzten Pyrimidins wurde eluiert und die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Tabellen 2, 3 und 4 wiedergegeben worden.

Tabelle 2: Die Umsetzung von Cytosin mit Dimethyl-nitrosamin im molaren Verhältnis 1:200 bei 30° (Vers. 1).

a: Konzentration an nicht umgesetztem Cytosin (%) bei der Umsetzung im pH 4.2 .

b: Konzentration an nicht umgesetztem Cytosin (%) bei der Umsetzung im pH 3.0 .

t (Stdn)	a	b
9	98	95
24	93	89
33	89	87
54	85	81
76	79	74
101	72	66

Tabelle 3: Die Umsetzung von Cytidin mit Dimethyl-nitrosamin im molaren Verhältnis 1:200 bei 30° (Vers. 2).

a: Konzentration an nicht umgesetztem Cytidin (%) bei der Umsetzung im pH 4.2 .

b: Konzentration an nicht umgesetztem Cytidin (%) bei der Umsetzung im pH 3.0 .

t (Stdn)	a	b
17	97	96
42	91	92
66	86	88
90	82	83
114	78	80
162	71	73

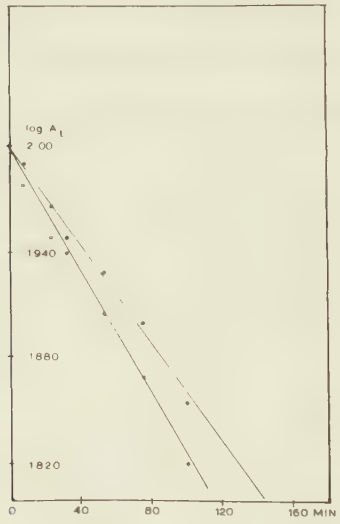


Abb. 1: Abbau von Cytosin durch Dimethyl-nitrosamin

● pH 4.2

o pH 3.0

Tabelle 4: Die Umsetzung von Cytidin-2'(3')-phosphorsäure mit Dimethyl-nitrosamin im molaren Verhältnis 1:200 und 1:400 bei 30° (Vers. 3).

a: Konzentration an nicht umgesetzter Cytidylsäure (%) bei der Umsetzung im molaren Verhältnis 1:200 im pH 4.2 .

b: Konzentration an nicht umgesetzter Cytidylsäure (%) bei der Umsetzung im molaren Verhältnis 1:400 im pH 3.0 .

t (Stdn)	a	b
7	93	100
24.5	87	91
31.5	81	87
48.75	71	84
56.5	72	80
72.75	63	78
81.5	62	75
105.75	53	63

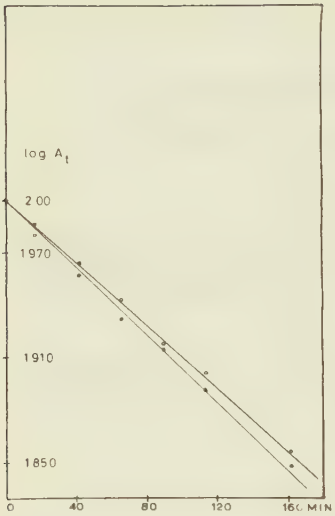


Abb. 2: Abbau von Cytidin durch Dimethyl-nitrosamin

- ● pH 4.2
- ○ pH 3.0

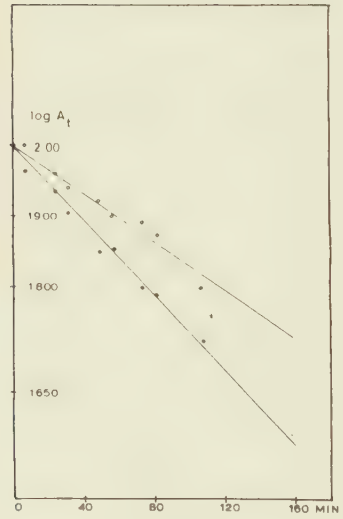


Abb. 3: Abbau von Cytidin-2'(3')-phosphorsäure durch Dimethyl-nitrosamin

- ● pH 4.2
- ○ pH 3.0

Die kinetische Auswertung der in den Tabellen 2, 3 und 4 angegebenen Zahlenwerte nach der graphischen Methode (Abbildung 1 bis 3) ergab, daß die Reaktion nach I. Ordnung verläuft. Da die eine Reaktionskomponente in sehr großem Überschuß vorhanden ist, ist anzunehmen, daß eine pseudomonomolekulare Reaktion vorliegt. Tabelle 5 enthält die dazugehörigen RGK und Halbwertszeiten.

Tabelle 5: RGK und Halbwertszeiten der Umsetzung von Dimethylnitrosamin mit Cytosin, Cytidin und Cytidin-2'(3')-phosphorsäure.

	pH	RGK $[min^{-1}]$	τ [min]
Cytosin	4.2	$5.3 \cdot 10^{-5}$	13000
	3.0	$6.7 \cdot 10^{-5}$	10400
Cytidin	4.2	$3.7 \cdot 10^{-5}$	18800
	3.0	$3.4 \cdot 10^{-5}$	20400
Cytidyl-	4.2	$10.2 \cdot 10^{-5}$	6800
säure	3.0	$6.9 \cdot 10^{-5}$	10000

Aus den Tabellen 2 bis 4 geht hervor, daß es zu einer Reaktion zwischen Cytosin, Cytidin bzw. Cytidylsäure und Dimethyl-nitrosamin kommt. Die papierchromatographische Suche nach den entsprechenden Uracil-Derivaten verlief jedoch negativ. Auch andere Pyrimidin-Derivate konnten nicht in den Reaktionslösungen nachgewiesen werden. Damit ist also anzunehmen, daß die Umsetzung des Nitrosamins mit dem Cytosin-System entweder nicht nach dem auf Seite 6 angegebenen Schema abläuft, oder daß der Zerfall des

Diazo-pyrimidins (10) nicht zum Uracil-Derivat, sondern unter Ringöffnung erfolgt.

2.2. Die Umsetzung der nicht cancerogenen Nitrosamine (1h) bis (1j) mit Cytidin.

Nachdem wir im Abschnitt 2.1. gezeigt haben, daß das cancerogene Dimethyl-nitrosamin mit Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure reagiert, haben wir überprüft, ob auch die nicht cancerogenen Nitrosamine (1h) bis (1j) eine derartige Reaktion zeigen. Wir haben deshalb Cytidin mit diesen Nitrosaminen umgesetzt und beobachteten, daß mit Ausnahme des schwach cancerogenen Di-i-propyl-nitrosamin innerhalb 150 Stunden keine Reaktion eintrat (Vers. 4). Die Tabelle 6 zeigt die nach der Umsetzung zurückgewonnenen Mengen an Ausgangsmaterial.

Tabelle 6: Die Umsetzung der nicht cancerogenen Nitrosamine (1h) bis (1j) mit Cytidin im molaren Verhältnis 200:1 bei 30° a).

Nitrosamin	Reaktionszeit [Stdn]	gefundene Menge Cytidin (%)
Methyl-t-butyl-	100	101
Methyl-phenyl-	148	101
Di-tolyl- b)	148	99
Di-i-propyl-	140	95
Dimethyl- c)	120	83

a) Da ein Teil der nicht cancerogenen Nitrosamine in den für die Untersuchung der cancerogenen Nitrosamine benutzten Lösungsmittel-Systemen nicht hinreichend löslich ist, wurde als Lösungsmittel 0.1 n HCl/Äthanol (1:1) verwandt.

b) Infolge der geringen Löslichkeit des Nitrosamins mußte mit einem molaren Verhältnis von 50:1 gearbeitet werden.

c) Die Umsetzung mit cancerogenem Dimethyl-nitrosamin erfolgte als Kontrollversuch.

2.3. Die Umsetzung von Dimethyl-nitrosamin mit anderen Pyrimidinen.

Aus den in Abschnitt 2.1. und 2.2. geschilderten Ergebnissen geht also hervor, daß zwischen der Cancerogenität des Nitrosamins und seinem reaktiven Verhalten gegenüber Cytosin und seinen Derivaten eine Korrelation besteht. Wir haben deshalb überprüft, wie sich andere Pyrimidine (Uracil, Uridin, Thymin usw.) unter analogen Bedingungen gegenüber Dimethyl-nitrosamin verhalten. Die Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen (Vers. 5).

Tabelle 7: Die Umsetzung von Dimethyl-nitrosamin mit verschiedenen Pyrimidinen im molaren Verhältnis 200:1 bei 30° in 0.1 n HCl/Äthanol (1:1).

Pyrimidin	Reaktionszeit [Stdn]	gefundene Menge Pyrimidin (%)
Uracil	144	98
Uridin	144	94
Thymin	144	97
4-Methyl-cytosin	200	100
5-Methyl-cytosin	200	70
4-Methyl-cytosin[x)]	200	100

x) Reaktion mit Methyl-t-butyl-nitrosamin

Aus der Tabelle 7 geht hervor, daß nur das Pyrimidin mit einer freien NH_2-Gruppe (5-Methyl-cytosin) mit dem Nitrosamin reagiert und daß bereits der Ersatz eines der beiden H-Atome der

freien NH_2-Gruppe durch eine Methylgruppe (4-Methyl-cytosin) eine Reaktion verhindert.

3. Die Einwirkung von Nitrosaminen auf Harnstoff und symm. Dimethyl-harnstoff.

Die Untersuchungen des Abschnittes 2 zeigen, daß die Reaktion mit den Nitrosaminen das Vorliegen einer NH_2-Gruppe voraussetzt. Um weiteren Einblick in die Art der Umsetzung zu erhalten, haben wir als Modell-Reaktion die Umsetzung der Nitrosamine (1a), (1b), (1h) bis (1j) und (3) mit Harnstoff und symm. Dimethyl-harnstoff untersucht.

Die Denitrosierung von Nitrosaminen in Gegenwart von Harnstoff bzw. Amidosulfonsäure ist in stark saurer Lösung an aromatischen Nitrosaminen von verschiedenen Arbeitskreisen untersucht worden (Lit. 11; 12). Die Untersuchungen beschränkten sich jedoch ausschließlich auf den Zusammenhang von RGK und Substitution im aromatischen Rest bzw. auf den Zusammenhang von RGK und der Hammetschen H_0-Funktion der eingesetzten Säuren (HCl, $HClO_4$, H_2SO_4). Eine nähere Aufklärung des Chemismus der Denitrosierung ist nicht erfolgt.

Um die zum Teil wasserlöslichen, zum Teil wasserunlöslichen Nitrosamine vergleichen zu können, wurde wie in Versuch 4 und 5 im System 0.1 n HCl/Äthanol (1:1) gearbeitet. Die Ansätze wurden im Verhältnis Nitrosamin zu Harnstoff 1:400 gehalten, um für die jetzt gemessene Abnahme des Nitrosamins eine nach I. Ordnung verlaufende Reaktion zu erhalten. Die Ergebnisse der Kinetik zeigen die Abbildung 4 und die Tabelle 8 (Vers. 6).

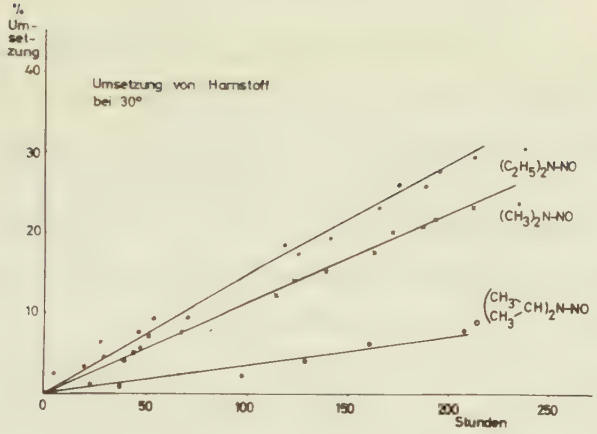


Abb. 4: Die Umsetzung verschiedener Nitrosamine mit Harnstoff im molaren Verhältnis 1:400 in 0.1 n HCl/Äthanol (1:1) bei 30°

Tabelle 8: RGK und Halbwertszeiten der Umsetzung verschiedener Nitrosamine mit Harnstoff.

Nitrosamin	Temperatur	RGK $[min^{-1}]$	τ [min]
Dimethyl-[x)]	30°	$2.1 \cdot 10^{-5}$	33300
Diäthyl-	30°	$2.5 \cdot 10^{-5}$	27300
"	40°	$2.7 \cdot 10^{-5}$	23600
Piperidin	30°	$2.1 \cdot 10^{-5}$	33300
"	40°	$4.3 \cdot 10^{-5}$	16100
Di-i-propyl-	30°	$< 10^{-5}$	> 70000
Methyl-t-butyl-	30°	0	-
Di-tolyl-	30°	0	-
Methyl-phenyl-	30°	0	-

x) Von R.ZAHRADNIK (Lit. 12) wurde beobachtet, daß Dimethylnitrosamin in stark saurer Lösung nicht mit Harnstoff reagiert.

Die Tabelle 8 zeigt, daß sich die Nitrosamine gegenüber Harnstoff analog wie gegenüber Cytosin und seinen Derivaten verhalten. In Übereinstimmung mit diesem Befund beobachteten wir, daß der symm. Dimethyl-harnstoff mit Dimethyl- bzw. Diäthyl-nitrosamin nicht reagiert (Vers. 7).

4. Die Überprüfung der Reaktionsmöglichkeiten von cancerogenen Nitrosaminen mit Nukleinsäurebestandteilen.

In den Kapiteln 2 und 3 ist gezeigt worden, daß Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure sowie Harnstoff mit den cancerogenen Nitrosaminen reagieren und daß die Reaktion eine freie NH_2-Gruppe voraussetzt. Beim symm. Dimethyl-harnstoff und 4-Methyl-cytosin bleibt die Reaktion aus. Die nicht cancerogenen Nitrosamine reagieren dagegen mit Cytosin und seinen Derivaten sowie mit Harnstoff nicht.

Diese experimentellen Befunde werfen folgende Fragen auf:

a) Verläuft die Reaktion - wie bereits auf Seite 6 angedeutet - über die intermediäre Bildung von NO^+-Ionen (bzw. anderer nitrosierender Teilchen) oder tritt das Nitrosamin unmittelbar mit dem Cytosin bzw. seinen Derivaten oder Harnstoff in Reaktion?
b) In welche Verbindungen gehen die Nitrosamine bei der Reaktion über?
c) Wie läßt sich chemisch der Unterschied zwischen cancerogenen und nicht-cancerogenen Nitrosaminen deuten?

Zur Klärung dieser Fragen haben wir die in den Abschnitten 4.1. bis 4.5. beschriebenen Versuche unternommen.

4.1. Die Einwirkung von salpetriger Säure auf Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure.

Im Zusammenhang mit der Frage, ob die Umsetzung von Nitrosaminen mit Cytosin und seinen Derivaten über die primäre Bildung von NO^+-Ionen (oder anderer nitrosierender Teilchen) abläuft, war - da darüber in der Literatur kein zuverlässiges Material vorliegt - als erstes zu prüfen, wie sich Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure gegen salpetrige Säure verhalten.

Die Umsetzung von Cytosin mit salpetriger Säure ist bereits von A.KOSSEL und H.STEUDEL im Jahre 1903 (Lit. 13) in präparativer Hinsicht untersucht worden. Sie erhielten aus 2 g Cytosin bei einer Reaktionstemperatur von fast 100° jedoch nur 0.2 g Uracil. Der Verbleib des restlichen eingesetzten Cytosins wurde von ihnen nicht aufgeklärt. 1923 beobachtete D.W.WILSON (Lit. 14), daß die Einwirkung von salpetriger Säure auf Guanin, Guanosin und Guanylsäure, sowie Adenosin und Cytosin bei 21 bis 26° unter Stickstoffentwicklung erfolgt. Dabei lieferten Guanin, Guanosin und Guanylsäure im Verlauf von 1-2 Stunden 8-27%, Cytosin sogar 37% mehr Stickstoff als für eine NH_2-Gruppe zu erwarten ist. Aus diesen Befunden geht hervor, daß es nicht nur zu einer Desaminierung durch die salpetrige Säure kommen kann, sondern daß auch andere Reaktionen ablaufen müssen. Im Gegensatz zu den bei Guanin, Guanosin, Guanylsäure und Cytosin gemachten Beobachtungen lieferte Adenosin die theoretisch zu erwartende Menge Stickstoff, während Uracil, Uridylsäure und Thymin keinerlei Stickstoffentwicklung bei der Umsetzung mit salpetriger Säure zeigten. In neuerer Zeit ist die Frage der Einwirkung von Natriumnitrit bzw. salpetriger Säure auf Nukleinsäuren eingehend von H.SCHUSTER und G.SCHRAMM (Lit. 15) untersucht worden, nachdem beobachtet worden war, daß salpetrige Säure mutierende Wirkung zeigt.

Um die bei der Umsetzung der cancerogenen Nitrosamine mit Cytosin, Cytidin und der Cytidylsäure gemachten Ergebnisse mit denen

der Umsetzung von salpetriger Säure vergleichen zu können, haben wir analoge Bedingungen wie bei der Umsetzung mit den Nitrosaminen gewählt. Auch die Aufarbeitung sowie die quantitative Bestimmung des eingesetzten Pyrimidins wurde wie für die Umsetzung der Nitrosamine beschrieben ausgeführt. Die Ergebnisse der Umsetzung von Cytosin mit salpetriger Säure bei 30° sind in den Tabellen 9 und 10 angegeben worden.

Tabelle 9: Die Umsetzung von Cytosin mit Natriumnitrit bei 30° (Vers. 8).

a: molares Verhältnis Cytosin zu $NaNO_2$ 1:400, pH 4.2
b: " " " " 1:400, pH 6.1
c: " " " " 1:200, pH 6.1
d: " " " " 1:200, pH 4.2

	gefundenes Uracil (%)				nicht umgesetztes Cytosin (%)			
t (Stdn)	a	b	c	d	a	b	c	d
5	0				0	0	40	0
30	0				0	0		0
48.5	0	20	54	15	0	0	31	0
77	0	12	44	2	0	0	14	0
101.5	0		22	0	0	0	9	0
122.5	0	11		0	0	0	6	0
144	0	8		0	0	0	4	0

Tabelle 10: Die Umsetzung von Cytosin mit Natriumnitrit im molaren Verhältnis 1:400 bei 30°, pH 4.2 (Vers. 9).

t (Stdn)	vorhandenes Cytosin (%)	gebildetes Uracil (%)
0	100	0
0.5	27	0
1	33	0
2	26	0
3	10	0
4	8	0
5	0	0
28	0	0

Aus der Tabelle 9 geht hervor, daß bei der Umsetzung von Cytosin mit Natriumnitrit im molaren Verhältnis 1:400 beim pH 4.2 kein, bei den anderen Versuchsbedingungen nicht die zu erwartende Menge an Uracil nachgewiesen werden kann, die zudem während der Reaktion abnimmt. Das eingesetzte Cytosin ist mit Ausnahme der Umsetzung 1:200, pH 6.1 in allen anderen Fällen bereits bei der ersten Entnahme völlig verbraucht worden.

Die Werte des Cytosins und des Uracils ergänzen sich jedoch nicht zu 100%, sodaß anzunehmen ist, daß entweder das gebildete Uracil mit der salpetrigen Säure weiterreagiert, oder daß das Cytosin mit salpetriger Säure andere Produkte bildet. Für die erste Annahme spricht der Befund, daß die beobachtete Uracil-Konzentration während der Reaktion abnimmt.

Die Tabelle 10 gibt einen Überblick über den Ablauf der Umsetzung von Cytosin mit Natriumnitrit im molaren Verhältnis

1:400 in den ersten 5 Stunden. Auch hier konnte kein Uracil nachgewiesen werden. Die hauptsächliche Umsetzung des Cytosins erfolgte bereits in den ersten 30 Minuten.

Diese Befunde stehen im Einklang mit Untersuchungen von E.LOCHMANN und W.STEIN (Lit. 16), die 1963 beobachteten, daß die Desaminierung von Cytosin beim pH 4.5 nach schneller Anfangsreaktion langsamer wird.

Um den obigen Befund, wonach Uracil mit salpetriger Säure reagiert, weiter zu belegen, haben wir Uracil mit salpetriger Säure unter den Bedingungen der Cytosin-Umsetzung zur Reaktion gebracht (Tab. 11).

Die Tabelle 11 zeigt, daß Uracil in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Tabellen 9 und 10 mit salpetriger Säure zur Reaktion zu bringen ist.

Dieser Befund steht im Widerspruch zu Beobachtungen von A.R. TODD (Lit. 17), der gefunden hatte, daß sich Uracil nicht mit salpetriger Säure umsetzen läßt.

Tabelle 11: Die Umsetzung von Uracil mit salpetriger Säure bei 30° in wässriger Lösung (Vers. 10).

Angegeben ist die noch vorhandene Menge an Uracil (%).

	molares Verhältnis 1:400			molares Verhältnis 1:200
t (Stdn)	pH 4.2	5.5	3.8	3.6
3	36	44		
8			5	39
19	36			
24			19	30
25.25	22	45		
31.5			0	46
44.25	24	33		
48.75			0	
51.25	20	29		
56.75			0	19
65.75	17	22		
75.5			0	25
76.25	12	19		
82.5			0	22
91.75	0	15		
96.45			0	20
98.5	0	12		
103.3			0	10
114.75	0			
119			0	

Cytidin liefert bei der Umsetzung mit Natriumnitrit (molares Verhältnis 1:200, pH 4.2 bzw. 5.5, 30°) die folgenden Ergebnisse (Versuch 11; Tabelle 12).

Tabelle 12: Die Umsetzung von Cytidin mit salpetriger Säure bei 30° (Vers. 11).

a: molares Verhältnis Cytidin zu $NaNO_2$ 1:200, pH 4.2

b: " " " " 1:200, pH 5.5

	gefundenes Uridin (%)		nicht umgesetztes Cytidin (%)	
t (Stdn)	a	b	a	b
17	90	73	0	41
42	91	68	0	34
66	66	66	0	12
90	38	60	0	9

Aus Tabelle 12 folgt, daß das Cytidin beim pH 4.2 quantitativ zu Uridin desaminiert wird, und daß das Uridin sowohl beim pH 4.2 wie auch beim pH 5.5 von der salpetrigen Säure abgebaut wird.

Die Umsetzung von Cytidylsäure mit Natriumnitrit (molares Verhältnis 1:200 bzw. 1:400, pH 4.2, 30°) führte schon nach 7 Stunden quantitativ zur erwarteten Menge Uridylsäure, die sich auch nach 160 Stunden Stehen der Ansätze bei 30° unter der Einwirkung von salpetriger Säure nicht veränderte (Versuch 12).

Dieser Befund steht im Einklang mit Ergebnissen, die von H.SCHUSTER und G.SCHRAMM (Lit. 15) 1958 publiziert wurden. Diese hatten bei der Einwirkung von salpetriger Säure auf

Tabakmosaikvirus gefunden, daß die Cytidylsäure quantitativ zu Uridylsäure desaminiert wird, und daß hierbei keine weiteren Nebenreaktionen, insbesondere Ringöffnungen stattfinden.

Aus den von uns ausgeführten und in Abschnitt 4.1. beschriebenen Versuchen geht also hervor, daß sowohl das Cytosin- als auch das Uracil-System durch Substitution am N-1-Atom in ganz auffälliger Weise hinsichtlich ihres chemischen Verhaltens verändert werden. Während sich diese Veränderung beim Übergang Cytosin / Cytidin bzw. Uracil / Uridin (Ersatz des N-1-H-Atoms durch den Ribose-Rest) durch die Beeinflussung der Ringtautomerie deuten läßt, kann für die Veränderung beim Übergang Cytidin / Cytidylsäure bzw. Uridin / Uridylsäure keine Erklärung gegeben werden [2].

4.2. Die gasvolumetrische und gaschromatographische Untersuchung der Umsetzung von Nitrosaminen mit Cytosin und seinen Derivaten.

Um zu überprüfen, ob bei der Umsetzung der cancerogenen Nitrosamine mit Cytosin bzw. Harnstoff eine, einer Desaminierung entsprechende, Stickstoffentwicklung erfolgt, wurde die Umsetzung von Dimethyl-nitrosamin mit Cytidin bzw. Harnstoff bei 30° in 0.1 n HCl/Äthanol (1:1) in einer WARBURG-Apparatur (Reaktionsdauer 100 Stunden) untersucht (Versuch 13). Wir konnten in keinem Fall eine Gasentwicklung nachweisen. Die chromatographische Untersuchung der Umsetzung von Cytidin mit Dimethyl-nitrosamin zeigte, daß die Reaktion während der Bestimmung zu 37% abgelaufen war.

---

2) Siehe dazu die Ausführungen bei G.DÖRHÖFER (Lit. 18).

In einem analogen Versuch mit Cytosin in einer größeren Gasbürette erhielten wir bei einem molaren Verhältnis von Dimethylnitrosamin zu Cytosin von 10:1 (Reaktionsdauer 200 Stunden) ebenfalls keinerlei Gasentwicklung (Versuch 14).

Nach Beendigung der Bestimmung wurde das Reaktionsgemisch zur Trockne abrotiert und der gelbe Rückstand extrahiert. Wir erhielten nur ein Öl, das nicht näher identifiziert werden konnte. Es zeigt bei 262 und 243 nm im UV-Spektrum ein Maximum.

Um zu untersuchen, was aus dem Nitrosamin bei der Umsetzung mit Cytosin bzw. seinen Derivaten wird, haben wir auf gaschromatographischem Wege überprüft, ob das Reaktionsgemisch nach der Umsetzung das entsprechende Amin enthält. Die Reaktionsansätze bestanden aus Lösungen von Dimethyl- bzw. Diäthyl-nitrosamin mit Cytosin, die in Meßkolben mit 0.1 n HCl/Äthanol (1:1) aufgefüllt wurden (Versuch 15). Nach 180 Stunden wurden die bei $+30^{\circ}C$ gehaltenen Lösungen am Rotationsverdampfer zur Entfernung des nicht umgesetzten Nitrosamins und des Lösungsmittels zur Trockne eingedampft. Der gut getrocknete Rückstand wurde quantitativ in 2 ml Meßkolben überführt, die dann mit etwas starker Lauge, um das Amin aus dem Hydrochlorid in Freiheit zu setzen, versetzt und mit absolutem Toluol aufgefüllt wurden. Die gaschromatographische Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Eichwerte der Abbildung 21 (Siehe Seite 89).

Tabelle 13: Gaschromatographische Untersuchung der Umsetzung von Dimethyl- und Diäthyl-nitrosamin mit Cytosin im molaren Verhältnis 200:1 (Vers. 15).

Nitrosamin	gefundene Menge Amin [a]	Abnahme an Nitrosamin [b]
Dimethyl-	30	25
Diäthyl-	37	30

a) in % Umsatz, bezogen auf die eingesetzte Menge Nitrosamin.
b) in %, spektroskopisch bestimmt.

Die gaschromatographischen Untersuchungen zeigen also, daß die Nitrosamine bei der Umsetzung praktisch quantitativ in die entsprechenden Amine übergehen.

4.3. Diskussion der möglichen Mechanismen der Umsetzung von Nitrosaminen mit Cytosin und seinen Derivaten.

Aus den Untersuchungen der Abschnitte 2 bis 4.2. ergeben sich folgende experimentelle Befunde:

a) Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure reagieren mit den Nitrosaminen (1a), (1b) und (3). In keinem Fall konnten bei der Umsetzung Uracil, Uridin bzw. Uridylsäure oder andere Pyrimidin-Derivate nachgewiesen werden. Die Nitrosamine (1h), (1i) und (1j) reagieren dagegen nicht mit Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure.

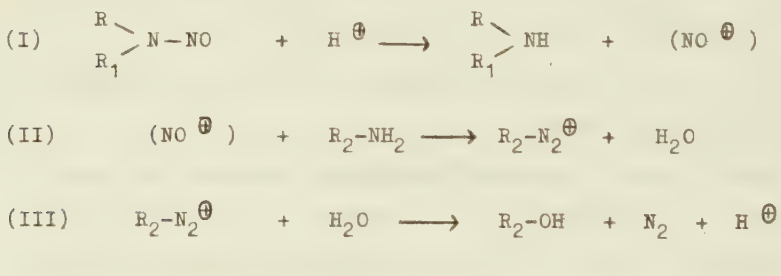
b) Bei der Umsetzung von Cytosin oder Cytidin mit salpetriger Säure läßt sich im Reaktionsgemisch Uracil bzw. Uridin nachweisen, deren Menge jedoch mit fortlaufender Reaktionszeit abnimmt, da beide Reaktionsprodukte unter den angewandten Bedingungen mit salpetriger Säure weiterreagieren. Die Umsetzung

von Cytidylsäure mit salpetriger Säure führt dagegen quantitativ zu Uridylsäure, die von salpetriger Säure nicht weiter verändert wird.

c) Bei der Umsetzung von Cytosin oder Cytidin mit Dimethyl-nitrosamin wird kein Stickstoff in Freiheit gesetzt; das eingesetzte Nitrosamin geht in das entsprechende Amin über.

d) Während Cytosin, Cytidin, Cytidylsäure und Harnstoff mit den cancerogenen Nitrosaminen (1a), (1b) und (3) reagieren, bleibt die Reaktion beim symm. Dimethylharnstoff und 4-Methyl-cytosin aus. Das Vorliegen einer freien NH_2-Gruppe scheint also Voraussetzung für die Reaktion zu sein.

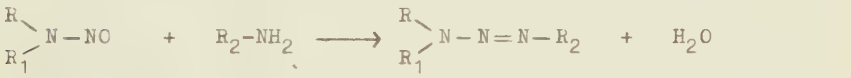
Die unter b) und c) aufgeführten Ergebnisse sprechen eindeutig gegen einen formalen Desaminierungsmechanismus entsprechend:



Bei diesem müßte - selbst wenn das intermediär entstehende Diazo-pyrimidin nicht quantitativ Stickstoff abspaltet - eine Stickstoffentwicklung nachzuweisen sein; zum anderen müßte, wie die Umsetzung von Cytidylsäure mit salpetriger Säure zeigt, zumindest bei der Umsetzung von Cytidylsäure mit den Nitrosaminen Uridylsäure nachzuweisen sein, was nicht der Fall ist.

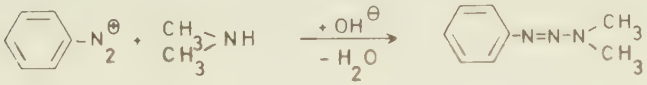
Wir vermuten deshalb, daß bei der Umsetzung von Cytosin, Cytidin oder Cytidylsäure mit Nitrosaminen eine, ihrer Natur nach unbekannte Reaktion unmittelbar zwischen der freien NH_2-Gruppe und dem Nitrosamin-Molekül selbst erfolgt, die beim Cytosin und seinen Derivaten zu einer Zerstörung des Pyrimidin-Systems führt.

Die weiter diskutierbaren Möglichkeiten einer intermediären Triazen-Bildung (11) oder einer Nitrosierung des Pyrimidinkerns scheiden auf Grund der unter c) bis d) zusammengefaßten experimentellen Ergebnisse aus.



(11)

Zwar zerfällt das von uns als Modellsubstanz nach Lit. 19 dargestellte Triazen (12) in saurer Lösung nach I. Ordnung mit einer RGK von $5.5 \cdot 10^{-3}$ $[min^{-1}]$, $\tau \cong 2$ Stunden (Abb. 5 und Tabelle 27; Versuch 16) und beweist damit die Instabilität derartiger Verbindungen im sauren Medium, jedoch erfolgt der Zerfall unter Gasentwicklung und widerspricht damit dem Befund c).



(12)

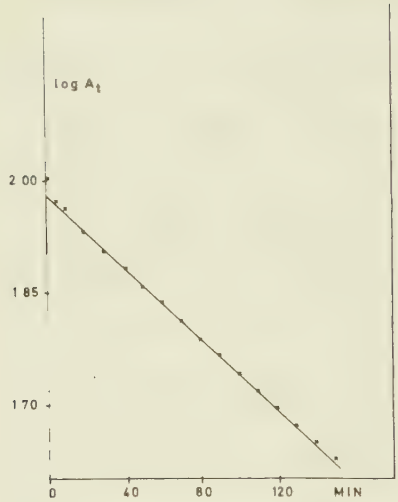


Abb. 5:

Zerfall des 3.3-Dimethyl-1-phenyl-triazens in saurer Lösung bei 30°

Da - wie erwähnt - Cytidylsäure mit salpetriger Säure quantitativ Uridylsäure bildet, scheidet auch die Möglichkeit einer intermediären Kern-Nitrosierung (primäre Bildung von NO^+-Ionen bzw. anderer nitrosierender Teilchen und deren Angriff an C-5-Atom des Pyrimidin-Kerns) aus, obwohl derartige 5-Nitroso-pyrimidine im allgemeinen in saurer Lösung instabil sind und unter Ringöffnung zerfallen (s. dazu Tabelle 14).

Tabelle 14: Verhalten von 5-Nitroso-pyrimidinen in saurem Medium (10^{-4} molare Lösung in 0.1 n HCl/Äthanol (1:1) bei 30^{o}.

Pyrimidin	Abnahme in 24 Stunden (%) [a]
5-Nitroso-2,6-dioxy-4-amino-	100
5-Nitroso-2,4-dioxy-	100
5-Nitroso-2-oxy-6-amino-	100

a) Die Abnahme wurde photometrisch mittels der spezifischen Banden bei 260 nm bestimmt.

Das unterschiedliche reaktive Verhalten der von uns untersuchten Nitrosamine gegenüber Cytosin, Cytidin oder Cytidylsäure, das mit der Cancerogenität der Nitrosamine in Korrelation steht, dürfte auf die unterschiedliche Raumerfüllung der Alkyl-Reste am Nitrosamin zurückzuführen sein. So weisen die nicht cancerogenen Nitrosamine (Diphenyl-, Methyl-phenyl-, Methyl-t-butyl- und Di-t-butyl-nitrosamin) im Gegensatz zu den cancerogenen Nitrosaminen sperrige, das "Amin"-N-Atom abschirmende Reste auf.

Die von uns ausgeführten Versuche beweisen, daß es zur Deutung der Cancerogenität bzw. Nicht-Cancerogenität der Nitrosamine nicht eines - zudem auch chemisch widersprüchlichen - Diazoalkan-Mechanismus bedarf. Sie machen weiter wahrscheinlich, daß der durch Nitrosamine verursachte Krebs durch die chemische Reaktion zwischen dem Nitrosamin und einer freien NH_2-Gruppe ausgelöst wird und daß damit die Krebsentstehung von nebulösen Vorstellungen befreit und auf chemische Reaktionen zurückgeführt werden kann. Wie die Versuche mit Harnstoff zeigen, müs-

sen außer der Reaktion mit dem Cytosin-Teil der DNS auch Reaktionen der Nitrosamine mit NH_2-Gruppen in Eiweißstoffen, Proteinen u.ä. in Betracht gezogen werden.

4.4. Versuche zur Aufklärung der bei der Umsetzung von Cytosin und Uracil mit salpetriger Säure entstehenden Verbindungen.

Bei der Umsetzung von Cytosin mit salpetriger Säure bildet sich nicht, wie in Abschnitt 4.1. beschrieben wurde, das erwartete Uracil. Auch andere Pyrimidine, die sich durch ihre spezifische Fluoreszenslöschung auf dem Papierchromatogramm als Fleck zu erkennen geben müßten, wurden nicht beobachtet. Um zu überprüfen, welche Produkte bei dieser Reaktion gebildet werden, haben wir versucht, das Reaktionsgemisch auf präparativem Wege aufzutrennen. Dazu wurde Cytosin mit Natriumnitrit im molaren Verhältnis 1:100 beim pH 4.2 60 Stunden bei 30° umgesetzt (Versuch 17). Danach wurde die Lösung mit Ammoniak neutralisiert, mit Pikrinsäure versetzt und mehrere Stunden bei 0° stehen gelassen. Dabei schied sich ein gelber Niederschlag eines Pikrats aus, dessen IR-Spektrum und NMR-Spektrum in den Abbildungen 6 und 7 wiedergegeben sind. Die Elementaranalyse des Pikrats sowie die Spektren deuten auf einen weitgehenden Abbau des Pyrimidin-Ringsystems hin. So fehlen z.B. im NMR-Spektrum die spezifischen Signale des -CH=CH- Systems des Cytosins bzw. Uracils. Es gelang uns jedoch nicht die Struktur dieser Verbindung aufzuklären. Versuche den Pikrat-Rest durch Chromatographie an Al_2O_3 oder an Ionenaustauschern abzutrennen, verliefen negativ.

Das gleiche Pikrat erhielten wir auch bei der Umsetzung von N-4-Acetyl-cytosin und Uracil mit Natriumnitrit unter den beim Cytosin angewandten Reaktionsbedingungen (Versuch 17).

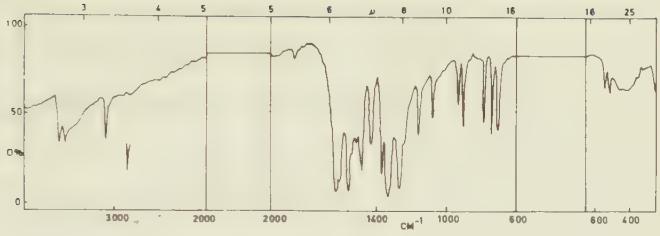


Abb. 6: IR-Spektrum des aus der Umsetzung von Cytosin mit salpetriger Säure erhaltenen Pikrats (KBr-Verfahren)

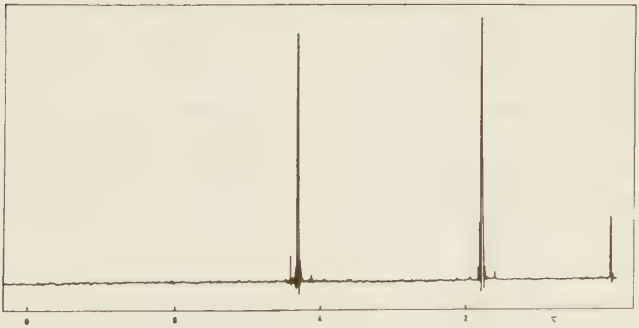


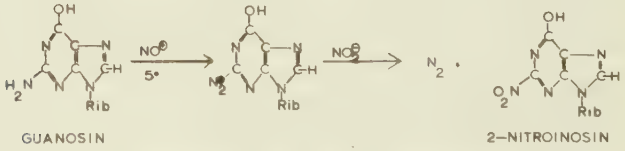
Abb. 7: NMR-Spektrum des aus der Umsetzung von Cytosin mit salpetriger Säure erhaltenen Pikrats in Deuterosulfoxyd

4.5. Die Einwirkung von salpetriger Säure bzw. von Dimethylnitrosamin auf Adenosin und Guanosin bei 30°.

Adenin und Guanin sind unter den von uns verwandten Bedingungen zu schwerlöslich, um mit salpetriger Säure oder Nitrosaminen umgesetzt werden zu können.

Die Umsetzung der entsprechenden Nukleotide Adenylsäure bzw. Guanylsäure mit salpetriger Säure ist von H.SCHUSTER und R.C.WILHELM (Lit. 20) bereits 1963 untersucht worden. Sie beobachteten, daß Natriumnitrit bei der Einwirkung auf Tabakmosaikvirus-Ribonukleinsäure bei einem pH von 5.0 in der Zeit von 12 bis 15 Tagen Adenylsäure zu 90-98% in Inosinsäure umwandelte, während Guanylsäure nur zu 35-55% als Xanthinsäure erhalten wurde. Weiter wurde von den Autoren gefunden, daß sich Xanthinsäure beim gleichen pH und Verwendung einer 1 m $NaNO_2$-Lösung auch in 96 Stunden nicht verändert. Die Bearbeiter schließen deshalb daraus, daß neben der Desaminierung der Guanylsäure eine unbekannte Reaktion mit Natriumnitrit abläuft.

Von R.SHAPIRO (Lit. 21), der die Umsetzung von Guanosin (13) mit salpetriger Säure kürzlich wieder untersuchte, wurde gefunden, daß bei der Reaktion 2-Nitro-inosin (15) gebildet wird. Er formulierte die Reaktion als nukleophile Substitution [3].



(13) (14) (15)

Wir erhielten bei der Umsetzung von Adenosin und Guanosin mit Natriumnitrit (molares Verhältnis 1:200, pH 4.2, 30°) die in Tabelle 15 angegebenen Ergebnisse (Versuch 18).

Tabelle 15: Die Umsetzung von Adenosin und Guanosin mit salpetriger Säure bei 30° (Vers. 18).

a: molares Verhältnis Adenosin zu $NaNO_2$ 1:200, pH 4.2

b: molares Verhältnis Guanosin zu $NaNO_2$ 1:200, pH 4.2

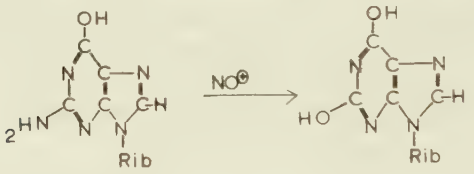
	gefundenes Inosin (%) x)	gefundenes Xanthin (%) x)
t (Stdn)	a	b
8	71	47
22	70	44
35	59	48
46	56	35
56	57	35
70	59	34
80	51	33
94	51	31
122	47	29

x) Bezogen auf die eingesetzte Menge an Adenosin bzw. Guanosin.

---

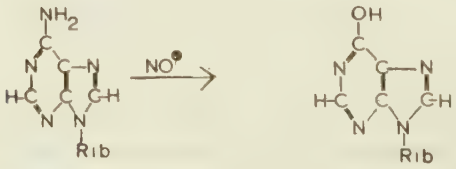
3) Wir bezweifeln wegen der geringen Ausbeute und der unter biologischen Bedingungen nicht vorkommenden niederen Temperatur von +5°C, daß diese von SHAPIRO gemachte Beobachtung zur Deutung des von SCHUSTER und WILHELM gefundenen Effektes herangezogen werden kann.

Die Werte der Tabelle 15 zeigen, daß weder Adenosin (17) noch Guanosin (13) quantitativ in ihre desaminierten Produkte Inosin (18) bzw. Xanthosin (16) übergeführt werden, und daß die gebildeten Inosin- und Xanthosin-Mengen im Laufe der Umsetzung abnehmen. Bereits nach 8 Stunden konnten im Reaktionsgemisch kein Adenosin bzw. Guanosin mehr nachgewiesen werden.



(13) (16)

Die analoge Umsetzung mit Dimethyl-nitrosamin bei 30° und einem pH von 4.2 und 3.0 führte auch beim molaren Verhältnis von 1:400 zu keiner Reaktion. Wir fanden bei verschiedenen Ansätzen innerhalb der Fehlergrenze unserer Bestimmungsmethode quantitativ das eingesetzte Adenosin bzw. Guanosin (Versuch 19).



(17) (18)

B) Die Einwirkung von UV-Strahlung auf Nukleinsäurebestandteile x)

1. Einleitung.

Die Einwirkung ultravioletter Strahlung auf biologisches Material ist in den letzten 10 Jahren sehr eingehend untersucht worden. Dabei zeigte sich, daß es überwiegend die Pyrimidin-Bestandteile sind, die von der UV-Strahlung angegriffen und verändert werden. Die sich dabei abspielenden chemischen Vorgänge lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen:

a) Die Addition von Wasser an die 5.6-Doppelbindung des Pyrimidin-Systems (Lit. 22 bis 29);

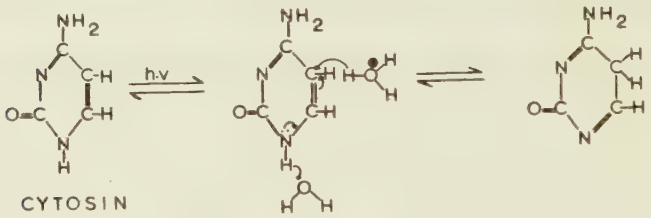
b) Die Bildung von dimeren Pyrimidinen (Lit. 30 bis 32).

Während die Frage der Wasseraddition an das Uracil-System durch eingehende Untersuchungen von H.GATTNER und E.FAHR (Lit. 26) geklärt werden konnte, ist bis jetzt noch offen, ob auch das Cytosin und das Thymin bzw. deren Nukleoside oder Nukleotide Wasser-Additionsprodukte (Derivate des 6-Hydroxy-5-dihydropyrimidins) bilden können. So verliefen Untersuchungen von S.Y. WANG (Lit. 33) über das Verhalten von Cytosin, Cytidin und der Cytidylsäure bei der UV-Bestrahlung in wässriger Lösung nicht eindeutig. Er konnte nur im ungepufferten, nicht dagegen im gepufferten wässrigen System bei der UV-Bestrahlung von Cyto-

---

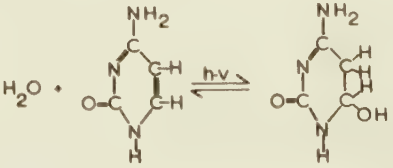
x) Dieser Teil der Dissertation wurde bereits publiziert:
R.KLEBER, E.FAHR und E.BOEBINGER, Naturwissenschaften 52, 513 (1965);
E.FAHR, R.KLEBER und E.BOEBINGER, Z. Naturforschg. 21b, 219 (1966).

sin ein reversibles Bestrahlungsprodukt nachweisen, für das WANG ohne nähere Beweise die folgende "Phototautomerisierung" zum Produkt (19) annahm.



(19)

D.SHUGAR und K.L.WIERZCHOWSKI (Lit. 34) diskutierten sowohl im gepufferten als auch ungepufferten wässrigen System ein Wasseranlagerungsprodukt der Struktur (20), während A.WACKER (Lit. 35) beim Cytosin-desoxy-ribosid eine reversible Dimerisierung annimmt. Eine Isolierung oder einwandfreie chemische Identifizierung der reversiblen Bestrahlungsprodukte gelang in keinem Fall.



(20)

Im folgenden zweiten Teil der vorliegenden Arbeit haben wir das Verhalten von Cytosin, Cytidin und Cytidin-2'(3')-phosphorsäure sowie einer Reihe anderer Nukleinsäure-Bestandteile in wässriger Lösung gegenüber UV-Strahlung untersucht.

2. Das Verhalten von Cytosin beim Bestrahlen mit UV-Strahlung in wässriger Lösung.

2.1. Die UV-Bestrahlung in ungepufferter wässriger Lösung.

Von R.L.SINSHEIMER (Lit. 23) war bereits 1949 festgestellt worden, daß Cytidylsäure beim Bestrahlen mit ultravioletttem Licht der Wellenlänge 254 nm eine Abnahme ihres Maximum bei 274 nm zeigt, die sich jedoch nach Beendigung der Bestrahlung als wieder rückläufig erweist. Erfolgte die Einwirkung der Strahlung nicht zulange, so wurde das alte Maximum wieder erreicht. K.L.WIERZCHOWSKI und D.SHUGAR (Lit. 28) konnten 1957 zeigen, daß das Cytosin bei Bestrahlung in saurer, alkalischer wie auch in ungepufferter wässriger Lösung in ein reversibles Bestrahlungsprodukt übergeht, das sich nach Beendigung der Bestrahlung spontan wieder in die Ausgangssubstanz zurückverwandelte. Von den Autoren wurde für dieses reversible Bestrahlungsprodukt keine Struktur angegeben.

Wir haben nun versucht, die Ergebnisse der obigen Autoren nachzuarbeiten und zu prüfen, welche Struktur diesem reversiblen Produkt zukommt.

Vorversuche zeigten bereits, daß es zweckmäßig ist, die auch bei Verwendung eines Niederdruckbrenners verbleibende Reststrahlung unter 230 nm auszufiltern, da diese eine irreversible Zerstörung des Cytosins und damit wohl auch des reversiblen Bestrahlungsproduktes zur Folge hat. So zeigt eine 10^{-4} m Cytosinlösung beim Bestrahlen mit der ungefilterten Strahlung eines Niederdruckbrenners in ungepufferter wässriger Lösung nach einer Bestrahlungszeit von 10, 20 bzw. 60 Minuten und Stehenlassen der Proben keinerlei Reversibilität, sondern nur irreversiblen Abbau (erkenntlich durch die Abnahme des Maximum bei 265 nm; Abbildung 8).

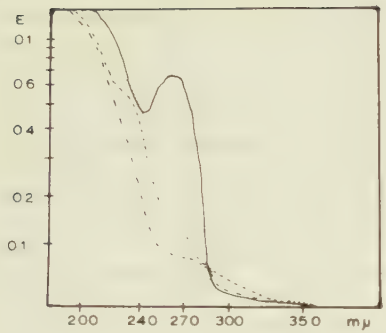


Abb. 8:

Bestrahlung einer 10^{-4} m ungepufferten wässrigen Cytosinlösung mit der ungefilterten Strahlung eines Niederdruckbrenners.

——— unbestrahlt
..... 10 Min. bestrahlt
– – – – 20 " "
–·–·– 60 " "

Führt man dagegen die Bestrahlung in einer Apparatur aus, bei der die Strahlung des Niederdruckbrenners mit Hilfe eines 0.1 m KBr-Filters (Schichtdicke 1cm) gefiltert wird, so beobachtet man bei 45 minütiger Bestrahlungsdauer eine Abnahme von 17-20% des vorhandenen Cytosins (gemessen über die Extinktion des Maximum bei 265 nm). Läßt man die Lösung stehen oder erhitzt sie kurz, so erhält man 97-100% der ursprünglichen Extinktion zurück.

Um die Vorgänge bei der Bestrahlung von Cytosin in ungepufferter wässriger Lösung näher und vor allem auch quantitativ zu verfolgen, wurden deshalb von uns Cytosinlösungen der Konzentration 10^{-4} m in ungepufferter wässriger Lösung bei Raumtemperatur unter Verwendung des angegebenen KBr-Mantels bestrahlt. Dabei zeigte sich, daß die Abnahme des Cytosins während der Bestrahlung weder dem Gesetz I. noch II. Ordnung folgt [4]. Wir

4) Von H.GATTNER und E.FAHR (Lit. 36) wurde bei der Bestrahlung des Uracils eine Abnahme nach I. Ordnung gefunden.

vermuten, daß dieser Effekt darauf zurückzuführen ist, daß sich die photochemische Reaktion der Umwandlung des Cytosins mit der langsameren Reaktion der Rückbildung des Photoprodukts in das Ausgangsprodukt überlagert, ein Prozeß, der beim Uracil wegen der Langsamkeit der Rückreaktion nicht zu beobachten ist [4].

Um die Rückverwandlung des Bestrahlungsproduktes des Cytosins kinetisch verfolgen zu können, wurde eine 10^{-4} m Cytosinlösung solange bestrahlt, bis eine 20-proz. Abnahme des eingesetzten Cytosins photometrisch zu beobachten war [5]. Nach Beendigung der Bestrahlung wurde eine Probe der Lösung in einer thermostatisierten Küvette im Spektralphotometer vermessen (Versuch 20 bis 22). Die Werte für die RGK und die Halbwertszeiten sind in Tabelle 16 angegeben. Die Abbildung 9 zeigt die graphische Bestimmung der RGK.

Tabelle 16: UV-Bestrahlung des Cytosins in ungepufferter wässriger Lösung. Kinetische Untersuchung des Zerfalls des reversiblen Bestrahlungsproduktes (Vers. 20-22).

t (°C)	$k \cdot 10^{+3}$ [min^{-1}]	τ [min]	1/T	log k + 3
20	2.0	350	0.00341	0.298
25	4.9	140	0.00336	0.689
30	7.9	90	0.00331	0.900

5) Der Wert von 20% erwies sich für eine kinetische Verfolgung des Zerfalls als besonders günstig. Bestrahlt man länger, so erhält man zwar auch eine größere Bildung von reversiblem Photoprodukt, jedoch machen sich irreversible Prozeße so stark bemerkbar, daß kinetisch schwer zu überschauende Systeme erhalten werden. Hält man die Bestrahlung so, daß, wie oben angegeben, nur 20% Abnahme des Cytosins erfolgt, so ist die Reversibilität ca. 97-100%.

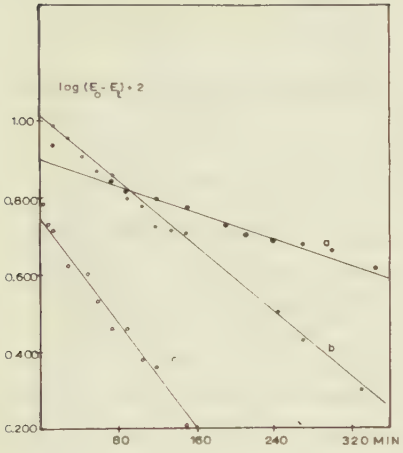


Abb. 9:

Zerfall des reversiblen Bestrahlungsproduktes von Cytosin in ungepufferter wässriger Lösung.

a: 20°
b: 25°
c: 30°

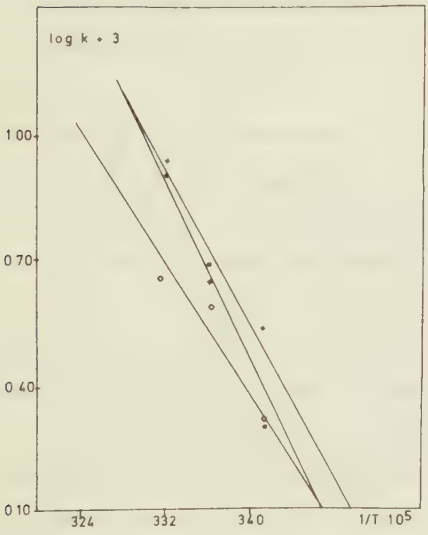


Abb. 10:

Bestimmung der Aktivierungsenergie E_A des Zerfalls des reversiblen Bestrahlungsproduktes von Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure in ungepufferter wässriger Lösung.

• Cytosin
o Cytidin
+ Cytidylsäure

Aus den bei 20, 25 und 30° bestimmten RGK ließ sich die Aktivierungsenergie E_A des Zerfalls des reversiblen Bestrahlungsproduktes von Cytosin zu 24 Kcal/Mol bestimmen.

2.2. Zerfall des reversiblen Bestrahlungsproduktes des Cytosins in wässriger gepufferter Lösung.

Die Bestrahlung des Cytosins im gepufferten System (pH 7.0) ist von S.Y.WANG (Lit. 33) 1959 untersucht worden. Er beobachtete, daß kein reversibles Bestrahlungsprodukt auftritt. Nachdem wir im ungepufferten System das reversible Bestrahlungsprodukt eindeutig nachweisen konnten, lag es nahe, anzunehmen, daß durch den Salzeffekt des Puffers die Umwandlung des reversiblen Bestrahlungsproduktes des Cytosins so schnell erfolgt, daß die Bildung eines reversiblen Bestrahlungsproduktes im gepufferten System praktisch nicht mehr nachgewiesen werden kann. Um diese Annahme zu überprüfen, haben wir Cytosin in wässriger Lösung bestrahlt und den jeweiligen Puffer erst nach Beendigung der Bestrahlung zugesetzt. Zur Ausführung wurde von uns eine 10^{-4} m Cytosinlösung bei Raumtemperatur unter Verwendung eines Niederdruckbrenners mit KBr-Filter bestrahlt, nach Abnahme der Cytosin-Konzentration um ca. 20% die Bestrahlung beendet und zu der so erhaltenen Lösung unmittelbar eine berechnete Menge an festem $Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$ zugegeben (pH der Lösung 7.4; Versuch 23).

Das Vermessen der Kinetik erfolgte wie in Abschnitt 2.1. beschrieben. Wir erhielten eine RGK bei 20° von $1.11 \cdot 10^{-2}$ $[min^{-1}]$ (Abb. 11), d.h. unter der Einwirkung des Salzeffektes hat sich die RGK um den Faktor 6 erhöht, die Halbwertszeit von τ =350 Min. auf τ =62 Min. vermindert. Damit ist es verständlich, daß WANG

unter den von ihm angewandten Bedingungen kein reversibles Bestrahlungsprodukt nachweisen konnte.

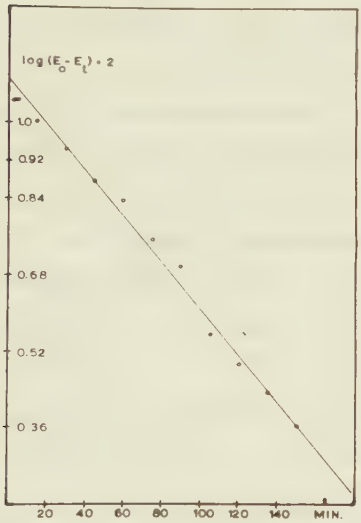


Abb. 11:

Zerfall des reversiblen Bestrahlungsproduktes von Cytosin in gepufferter Lösung (pH 7.4) bei 20°

2.3. Der Zerfall des reversiblen Bestrahlungsproduktes von Cytosin im sauren oder alkalischen Mileau.

Wie in der Einleitung zu diesem Teil der Arbeit bereits ausgeführt wurde, hatte S.Y.WANG (Lit. 33) bei der UV-Bestrahlung des Cytosins im sauren oder alkalischen Mileau ein reversibles Bestrahlungsprodukt des Cytosins nachweisen können, für das er die in der Einleitung angegebene Phototautomerie diskutierte. Da wir bereits bei einem pH von 7.4 im gepufferten System einen sehr schnellen Zerfall des reversiblen Bestrahlungsproduktes

beobachteten (vgl. Seite 42), lag es nahe, anzunehmen, daß die von WANG diskutierte Phototautomerie auf einer Fehlbeobachtung basiert. Es ist vielmehr zu erwarten, daß das reversible Photoprodukt des Cytosins entweder im sauren oder alkalischen Medium überhaupt nicht gebildet wird, oder aber noch schneller zerfällt als im gepufferten System bei pH 7.4 .

Um die Angaben von WANG zu überprüfen, haben wir eine 10^{-4} m Lösung von Cytosin in 0.1 n HCl 60 Minuten bestrahlt [6]. Eine Reversibilität konnte in keiner Weise festgestellt werden.

Bestrahlten wir eine wässrige Lösung von Cytosin, wie in Abschnitt 2.1. angegeben, bis zu einer Abnahme von 20% und gaben dann Alkali bis zum pH 11.4 dazu, so beobachteten wir eine Halbwertszeit von ca. 1 Minute.

3. Versuch einer chemischen Synthese des reversiblen Bestrahlungsproduktes von Cytosin.

In Abschnitt 2 konnten wir zwar nachweisen, daß Cytosin ein, wenn auch relativ instabiles Bestrahlungsprodukt bildet, offen ist jedoch die Struktur dieses reversiblen Photoproduktes. Zwar ist es naheliegend, in Anlehnung an die Untersuchung von H.GATTNER und E.FAHR (Lit. 26) eine Addition von Wasser an das Cytosinmolekül im Sinne der Struktur (20) anzunehmen, jedoch bedarf diese Annahme eines eindeutigen chemischen Beweises.

Um diesen zu führen, haben wir versucht, in Analogie zur Synthese des 6-Hydroxy-dihydrouracils (H.GATTNER, Lit. 36) ein

---

6) Die Bestrahlung erfolgte unter Bedingungen, wie sie WANG verwandt hatte.

entsprechendes Cytosin-Derivat zu synthetisieren (Versuch 24).

Dazu wurde von uns zu einer wässrigen Cytosinlösung solange Bromwasser gegeben, bis ein geringer bleibender Uberschuss an Brom durch Kaliumjodid/Stärke-Papier nachgewiesen werden konnte. Darauf wurde das Reaktionsgemisch unter Zugabe von Raney-Nickel und Bariumcarbonat hydriert, dann filtriert und die so erhaltene Lösung im Spektralphotometer vermessen. Sie zeigte nur beim Erwärmen auf 80° einen Extinktionsanstieg von 7%. Die papierchromatographische Untersuchung (System: n-Propanol/n-Butanol/Wasser 1:1:1) der Hydrierungslösung nach dem Erwärmen ergab 76% der eingesetzten Menge an Cytosin und ca. 0.3% Uracil (bezogen auf Cytosin, das als 100% gesetzt wurde) [7].

Wir konnten auf dem Papier keine Bromverbindung des Cytosins oder Uracils [8] nachweisen.

Der oben beschriebene Versuch läßt keine eindeutige Aussage zu. Es ist durchaus möglich, daß zwar das erwartete 6-Hydroxydihydrocytosin gebildet worden ist, daß dieses jedoch unter dem Einfluß des Reaktions-Mileaus zu schnell wieder in Cytosin zerfällt, um nachgewiesen werden zu können.

---

7) Die Bildung von Uracil ist nach G.HILBERT und F.JANSEN (Lit. 37) immer dann zu beobachten, wenn die 5.6-Doppelbindung des Cytosins aufgehoben wird.

8) H.L.WHEELER und T.B.JOHNSON (Lit. 38) vermuten, daß bei der Einwirkung von Bromwasser auf Cytosin eine oxydative Zerstörung der Aminogruppe erfolgt.

4. Das Verhalten von Cytidin beim Bestrahlen mit UV-Strahlung in wässriger Lösung.

4.1. Die UV-Bestrahlung in wässriger ungepufferter Lösung.

Wie von H.GATTNER (Lit. 36) gefunden wurde, nimmt in der Reihe Uracil, Uridin, Uridylsäure die Beständigkeit der Wasser-Additionsprodukte zu. Es war deshalb anzunehmen, daß die gleiche Reihenfolge auch für das Cytosin Gültigkeit hat. In Übereinstimmung mit dieser Annahme wurde von S.Y.WANG (Lit. 33) beobachtet, daß Cytidin sowohl in gepufferter als auch in ungepufferter Lösung ein reversibles Bestrahlungsprodukt bildet. Die von ihm abgeschätzte Halbwertszeit von nur 30 Minuten in gepufferter Lösung ließ eine wesentlich größere Halbwertszeit im ungepufferten wässrigen System erwarten.

Tabelle 17: UV-Bestrahlung des Cytidins in ungepufferter wässriger Lösung. Kinetische Untersuchung des Zerfalls des reversiblen Bestrahlungsproduktes (Vers. 25-27).

t (°C)	$k \cdot 10^{+3}$ [min^{-1}]	τ [min]	1/T	log k + 3
20	2.0	340	0.00341	0.308
25	3.8	180	0.00336	0.582
30	4.4	150	0.00331	0.647

Die Bestimmung des Zerfalls des reversiblen Bestrahlungsproduktes von Cytidin wurde von uns wie beim Cytosin beschrieben ausgeführt (Versuch 25-27). Wir bestrahlten eine 10^{-4} m Cytidinlösung 15 Minuten unter Verwendung eines KBr-Filters (Abnahme der Extinktion um 45-50%; Reversibilität 95-100%). Die

Bestimmung der RGK für die Temperaturen 20, 25 und 30° erfolgte graphisch (Abb. 12; Tabelle 17).

Die Bestimmung der Aktivierungsenergie (Abb. 10) lieferte einen Wert von 18 Kcal/Mol. Er entspricht ungefähr dem Wert von 15.5 Kcal/Mol, der von K.L.WIERZCHOWSKI und D.SHUGAR (Lit. 39) aus den Daten von K.L.SINSHEIMER (Lit. 40) errechnet wurde. Der Unterschied der Werte ist sicherlich darauf zurückzuführen, daß wir im ungepufferten Medium, SINSHEIMER dagegen in gepufferter Lösung gearbeitet hat.

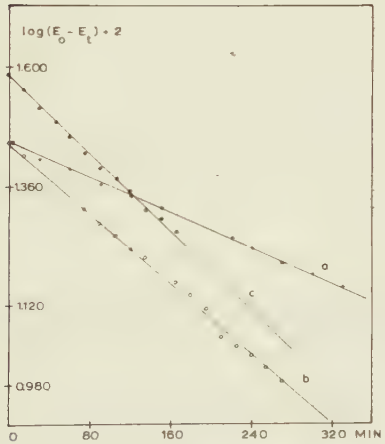


Abb. 12:

Zerfall des reversiblen Bestrahlungsproduktes von Cytidin in ungepufferter wässriger Lösung.

a: 20°
b: 25°
c: 30°

Interessant ist, daß bei der Bestrahlung des Cytidins nicht nur die üblicherweise beobachtete Abnahme des Maximum bei 265 nm erfolgt, sondern daß sich im Gegensatz zum Cytosin bei 235 nm ein neues Maximum in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer aus-

bildet (Abb. 13). Beim Erhitzen der Bestrahlungslösung geht das Spektrum wieder auf seine ursprüngliche Form zurück.

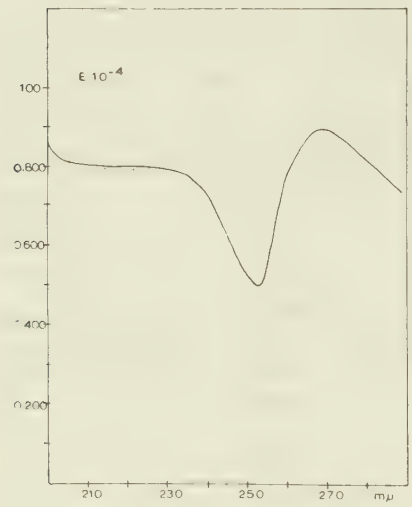


Abb. 13:

UV-Spektrum einer 10^{-4} m Cytidinlösung.

—— unbestrahlte Lösung

.... 30 Min. bestrahlte Lösung

4.2. Der Zerfall des reversiblen Bestrahlungsproduktes des Cytidins im gepufferten Medium.

Die Bestrahlung wurde wie in Abschnitt 4.1. beschrieben ausgeführt; und zwar wurde nach Beendigung der Bestrahlung der Puffer ($Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$; pH 7.4) zugegeben. Die RGK bei 20° wurde zu $4.9 \cdot 10^{-3}$ $[min^{-1}]$, die Halbwertszeit zu 140 Minuten gefunden (Abb. 14; Vers. 28). Die analog ausgeführte Bestrahlung von Cytidin mit anschließendem Vermessen des Zerfalls in alkalischer Lösung (nach Beendigung der Bestrahlung nachträgliche Zugabe von

$Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$; pH 11.4) ergab für 20° eine RGK von $2.6 \cdot 10^{-1}$ [min^{-1}] und eine Halbwertszeit von ca. 3 Minuten (Vers. 29).

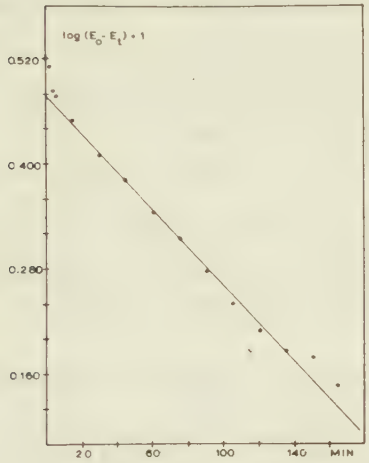


Abb. 14:

Zerfall des reversiblen Bestrahlungsproduktes von Cytidin in gepufferter Lösung (pH 7.4) bei 20°.

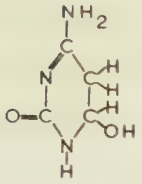
5. Versuche zur chemischen Synthese des reversiblen Bestrahlungsproduktes des Cytidins.

Wie in Abschnitt 3 beschrieben wurde, gelang es uns nicht, nach der von H.GATTNER angegebenen Methode ein 6-Hydroxy-dihydrocytosin der Struktur (20) zu synthetisieren. Da die Beständigkeit des reversiblen Bestrahlungsproduktes des Cytidins wesentlich größer ist als die des Cytosins, haben wir nun versucht, ein 6-Hydroxy-dihydrocytidin zu synthetisieren (Versuch 30). Dazu wurde von uns eine 10^{-2} m Cytidinlösung solange mit Bromwasser versetzt, bis ein geringer Bromüberschuss mit KJ/Stärke nachge-

wiesen werden konnte. Das Reaktionsgemisch wurde dann der Hydrierung in Gegenwart von Bariumcarbonat und Raney-Nickel unterworfen, filtriert und die so erhaltene Hydrierungslösung nach entsprechender Verdünnung in einer thermostatisierten Küvette spektrophotometrisch untersucht. Sie zeigte eine Zunahme des charakteristischen Maximum bei 270 nm. Die graphische Auswertung lieferte eine RGK I. Ordnung von $7.3 \cdot 10^{-3}$ $[min^{-1}]$ und eine Halbwertszeit von 95 Minuten. Obwohl dieser Wert nicht unmittelbar mit dem bei der Untersuchung der Bestrahlungslösung gefundenen übereinstimmt, ist doch auf Grund dieser Ergebnisse anzunehmen, daß bei der hydrierenden Debromierung das gleiche Produkt entsteht wie bei der Bestrahlung.

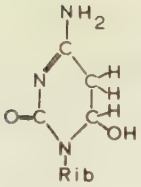
Die geringe Halbwertszeit des bei der Hydrierung erhaltenen Produktes ist sicherlich darauf zurückzuführen, daß die durch die chemischen Syntheseschritte in die Lösung eingeschleppten anorganischen Salze durch ihren Salzeffekt eine Verringerung der Halbwertszeit bewirken.

Die papierchromatographische Untersuchung (System: n-Propanol/n-Butanol/Wasser 1:1:1) der Hydrierungslösung lieferte nach dem Erhitzen neben Cytidin und einer sehr geringen Menge einer unbekannten Substanz nur Uridin. Da unter den Bedingungen der oben beschriebenen Synthese in keiner Weise Substanzen gebildet werden können, die der von S.Y.WANG (Lit. 33) diskutierten Phototautomerie entsprechen, darf als gesichert angesehen werden, daß das reversible Bestrahlungsprodukt des Cytidins das 6-Hydroxy-dihydrocytidin (21) ist. Darüber hinaus kann in Analogie dazu angenommen werden, daß auch dem reversiblen Bestrahlungsprodukt des Cytosins die 6-Hydroxy-dihydrocytosin-Struktur (20) zukommt.



6-Hydroxy-dihydrocytosin

(20)



6-Hydroxy-dihydrocytidin

(21)

6. Das Verhalten von Cytidin-2'(3')-phosphorsäure beim Bestrahlen mit UV-Strahlung in wässriger Lösung.

6.1. Die UV-Bestrahlung in ungepufferter wässriger Lösung.

Die Messung der Zerfallsgeschwindigkeit des reversiblen Bestrahlungsproduktes der Cytidylsäure läßt sich am besten so ausführen, daß in der schon erwähnten Apparatur eine 10^{-4} m Cytidylsäurelösung bis zu einer Extinktionsabnahme von 45% bestrahlt wird (25 Minuten Bestrahlungsdauer). Die kinetische Bestimmung der Halbwertszeiten und der hGK erfolgte wiederum wie in den anderen Fällen in thermostatisierten Küvetten (Tabelle 18; Abb. 15; Versuch 31-33).

Die Aktivierungsenergie E_A errechnet sich zu 21 Kcal/Mol (Abb. 10). Sie ist damit nahezu gleich der des Cytidins.

Tabelle 18: UV-Bestrahlung der Cytidin-2'(3')-phosphorsäure in ungepufferter wässriger Lösung. Kinetische Untersuchung des Zerfalls des reversiblen Bestrahlungsproduktes (Vers. 31-33).

t (^{o}C)	$k \cdot 10^{+3}$ [min^{-1}]	τ [min]	1/T	log k + 3
20	3.4	200	0.00341	0.530
25	4.4	150	0.00336	0.647
30	8.7	80	0.00331	0.938

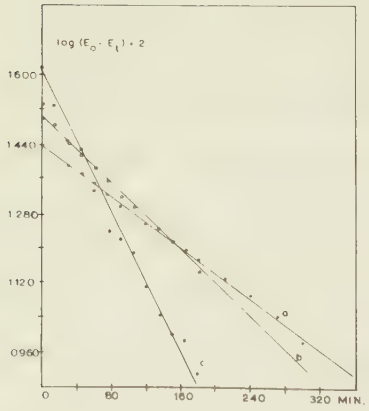


Abb. 15:

Zerfall des reversiblen Bestrahlungsproduktes der Cytidin-2'(3')-phosphorsäure in ungepufferter wässriger Lösung.

a: 20^{o}
b: 25^{o}
c: 30^{o}

6.2. Der Zerfall des reversiblen Bestrahlungsproduktes der Cytidin-2'(3')-phosphorsäure im gepufferten Medium des pH 7.4 .

Die Untersuchung wurde wie bereits beschrieben so ausgeführt, daß nach der Bestrahlung (Extinktionsabnahme bei 272 nm 45%) das als Puffer verwendete Salz ($Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$, bzw. $Na_2HAsO_4 \cdot 7\ H_2O$) zugegeben und danach die Kinetik bei 20° vermessen wurde (Versuch 34 bis 35; Abb. 16).

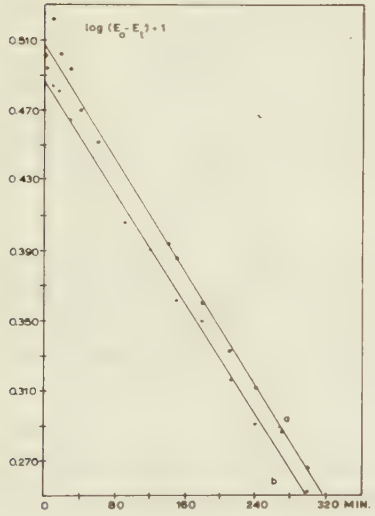


Abb. 16:

Zerfall des reversiblen Bestrahlungsproduktes der Cytidin-2'(3')-phosphorsäure in gepufferter Lösung (pH 7.4) bei 20°.

a: $Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$
b: $Na_2HAsO_4 \cdot 7\ H_2O$

Gefunden wurde für die beiden Puffer eine HGK von $1.9 \cdot 10^{-3}$ bzw. $1.8 \cdot 10^{-3}$ $[min^{-1}]$ und eine Halbwertszeit von 372 bzw. 381 Minuten, die beide innerhalb der Fehlergrenze übereinstimmen.

Vergleicht man die Reihe Cytosin, Cytidin, Cytidylsäure in gepufferter Lösung, so erhält man den gleichen Gang wie in der Uracil-Reihe, d.h. die Beständigkeit nimmt in der Reihenfolge Cytosin, Cytidin, Cytidylsäure d.h. in Richtung Nukleinsäure zu (Tabelle 19).

Tabelle 19: Zerfall der reversiblen Bestrahlungsprodukte des Cytosins, Cytidins und der Cytidylsäure in gepufferter Lösung (pH 7.4) bei 20°.

reversibles Bestrahlungsprodukt von	$k \cdot 10^{+3}$ [min^{-1}]	τ [min]
Cytosin	11.1	62
Cytidin	4.9	140
Cytidylsäure	1.9	372

Orientierende Versuche, wie sich der Zerfall des reversiblen Bestrahlungsproduktes der Cytidylsäure in Gegenwart von Neutralsalzen verhält, ergaben die in Tabelle 20 und Abbildung 17 gefundenen Werte (Vers. 36-37).

Tabelle 20: Zerfall des reversiblen Bestrahlungsproduktes der Cytidin-2'(3')-phosphorsäure in Gegenwart von Neutralsalzen in wässriger Lösung bei 20°.

Salzkonzentration	$k \cdot 10^{+3}$ [min^{-1}]	τ [min]
$3 \cdot 10^{-2}$ m Na_2SO_4	5.8	120
$6 \cdot 10^{-2}$ m NaCl	3.6	190

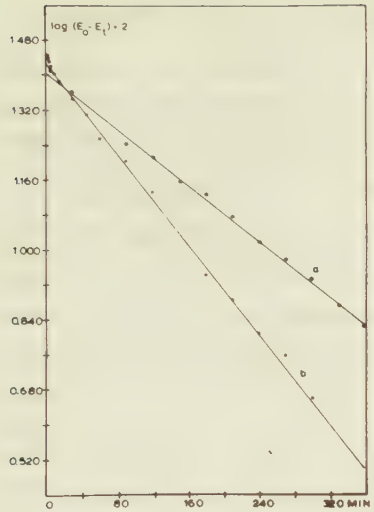


Abb. 17:

Zerfall des reversiblen Bestrahlungsproduktes der Cytidylsäure in Gegenwart von Neutralsalzen bei 20°.

a: $6 \cdot 10^{-2}$ m NaCl
b: $3 \cdot 10^{-2}$ m Na_2SO_4

6.3. Der Zerfall des reversiblen Bestrahlungsproduktes der Cytidin-2'(3')-phosphorsäure im alkalischen Medium.

Zu einer 10^{-4} m Cytidylsäurelösung wurde nach 25 minütiger Bestrahlung (Extinktionsabnahme 45% bei 272 nm) eine Menge von 40 mg festem Natriumhydroxyd unter Kühlung zugegeben (Vers. 38). Der pH-Wert der Lösung betrug 11.4 . Die Bestimmung des Zerfalls des reversiblen Bestrahlungsproduktes lieferte (Abb. 18) eine RGK von $1.15 \cdot 10^{-1}$ $[min^{-1}]$ und eine Halbwertszeit von 6 Minuten.

Die Wiederholung des Versuches unter Verwendung einer Lösung von $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$, die zum gleichen pH-Wert führte, ergab eine RGK von $8.5 \cdot 10^{-2}$ $[min^{-1}]$ und eine Halbwertszeit von 8 Minuten (Versuch 39).

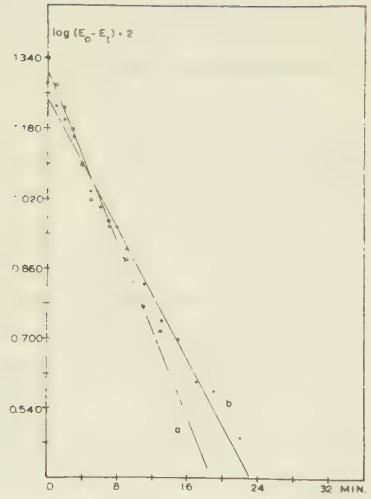


Abb. 18:

Zerfall des reversiblen Bestrahlungsproduktes der Cytidin-2'(3')-phosphorsäure in wässriger Lösung (pH 11.4) bei 20°.

a: 10^{-2} m NaOH
b: 10^{-2} m Na_3PO_4

7. Darstellung des reversiblen Bestrahlungsproduktes der Cytidin-2'(3')-phosphorsäure.

7.1. Darstellung durch chemische Synthese.

Die in Analogie zur Synthese des reversiblen Bestrahlungsproduktes des Cytidins ausgeführte Synthese des reversiblen Bestrahlungsproduktes der Cytidylsäure führte nach dem Abfiltrieren des Raney-Nickels und des Bariumcarbonats zu einer Lösung, die beim Stehen eine Zunahme des Maximum bei 272 nm zeigte. Die bei 20° vermessene Kinetik dieser Zunahme ergab eine RGK von $1.5 \cdot 10^{-2}$ [min^{-1}] und eine Halbwertszeit von 45 Minuten (Vers. 40).

Diese kurze Lebensdauer machte eine Isolierung auf normalem chromatographischen Wege oder auch durch Elektrophorese unmöglich.

Da sich jedoch gezeigt hatte, daß die Halbwertszeit des reversiblen Bestrahlungsproduktes der Cytidylsäure in einer gepufferten Lösung des pH 7.4 auf ca. 6 Stunden ansteigt (siehe Tabelle 19), schien es uns sinnvoll, die chemische Synthese in diesem Medium auszuführen. Für die Isolierung des Produkts wählten wir die schnell verlaufende Dünnschicht-Chromatographie an Polyäthylenimin-Cellulose mit einer neutralen Kochsalzlösung als Fließmittel (Vers. 41).

Die Abbildung 19 zeigt das Chromatogramm der filtrierten Hydrierungslösung. Wir erhielten neben nicht umgesetzter Cytidylsäure (R_f 0.35) einen neuen Fleck (R_f 0.39), sowie einen Fleck mit R_f 0.52, der sich als Uridylsäure erwies.

7.2. Darstellung durch UV-Bestrahlung von Cytidylsäure.

Zur photochemischen Synthese des reversiblen Bestrahlungsproduktes der Cytidylsäure wurde eine 10^{-3} m Lösung von Cytidylsäure in 10^{-2} m Na_2HPO_4-Lösung (Halbwertszeit des reversiblen Bestrahlungsproduktes 370 Minuten) 60 Minuten lang mit dem Niederdruckbrenner NK 25/7 (0.1 m KBr-Lösung als Filter in 1 cm Schichtdicke) bestrahlt. Bei der Chromatographie - wie in Abschnitt 7.1. beschrieben - an Polyäthylen-imin-Cellulose fanden wir neben nicht umgesetzter Cytidylsäure (R_f 0.35) den gleichen Fleck (R_f 0.38) wie bei der in Abschnitt 7.1. beschriebenen Synthese. Beim Eluieren mit 0.1 n HCl erwies er sich als Cytidylsäure. Das Mengenverhältnis von nicht umgesetzter und durch Eluieren des

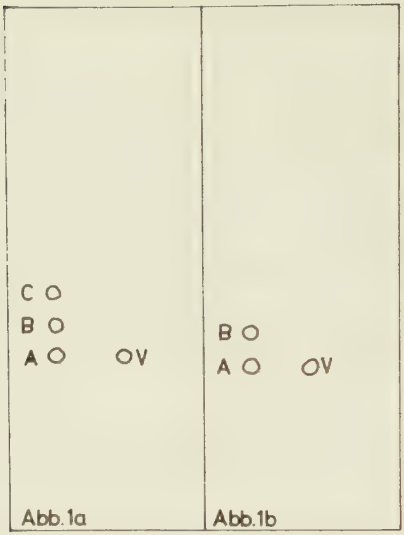


Abb. 19:

1a: Dünnschichtchromatogramm der Umsetzung von Cytidylsäure mit Brom nach der Hydrierung.

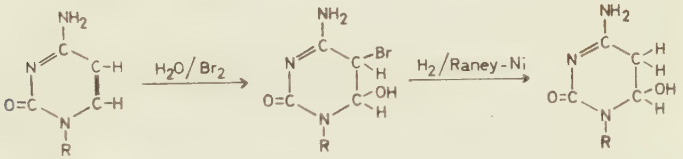
1b: Dünnschichtchromatogramm der Cytidylsäure-Bestrahlungslösung.

A: Cytidin-2'(3')-phosphorsäure;
B: 6-Hydroxy-dihydro-cytidin-2'(3')-phosphorsäure;
C: Uridin-2'(3')-phosphorsäure;
V: Vergleich Cytidin-2'(3')-phosphorsäure.

Flecks von R_f 0.39 erhaltener Cytidylsäure betrug ca. 4:1 (Versuch 42; Abbildung 19).

Es entsteht also bei der UV-Bestrahlung einer wässrigen Lösung von Cytidylsäure ein mit der synthetisierten Substanz identisches Bestrahlungsprodukt, das sich auf dem Polyäthylen-imin-Cellulose-Chromatogramm deutlich von nicht umgesetzter Cytidylsäure unterscheidet, und das sich entweder schon auf der Platte oder aber beim Eluieren mit 0.1 n HCl wieder in Cytidylsäure umwandelt.

Die von der Cytidylsäure ausgehende, über die Addition von HOBr an Cytidylsäure (22) verlaufende chemische Synthese, die zu einer mit dem Bestrahlungsprodukt identischen Substanz führt, belegt die 6-Hydroxy-dihydro-cytidylsäure-Struktur (23) des reversiblen Bestrahlungsproduktes und schließt die von WANG diskutierte Phototautomerie eindeutig aus [9].



R = H
R = Ribosyl
R = Ribosyl-2'(3')-phosphorsäure

(22) (23)

9) Nach Abschluss unserer Untersuchungen erschien eine Arbeit von H.E.JOHNS, J.C.LEBLANC und K.B.FREEMAN (Lit. 41), in der die Autoren eine Isolierung des reversiblen Bestrahlungsproduktes der Cytidylsäure durch Elektrophorese bei tiefer Temperatur beschreiben.

Werden zur photochemischen Darstellung der 6-Hydroxy-dihydrocytidylsäure die von uns beschriebenen Bestrahlungsbedingungen verwandt, so ist die Bestrahlungslösung unmittelbar nach Beendigung der Bestrahlung frei von Uridylsäure (s. Abb. 19b). Da K.W. BRAMMER (Lit. 42) bei seinen Bromierungsversuchen von Cytidylsäure keine Bildung von Uridylsäure beobachtete, kann die von uns bei der chemischen Synthese der 6-Hydroxy-dihydrocytidylsäure gefundene Uridylsäure (s. Abb. 19a) nicht bei der Umsetzung von Cytidylsäure mit Br_2/H_2O, sondern nur durch Desaminierung der 6-Hydroxy-dihydrocytidylsäure entstanden sein. Dieser Befund bestätigt die von H.SCHUSTER (Lit. 43) gemachten Beobachtungen, wonach die Desaminierung der 6-Hydroxy-dihydrocytidylsäure bei der Bestrahlung von Cytidylsäure nicht auf die unmittelbare Wirkung der Strahlung zurückzuführen ist, sondern als "Dunkelreaktion" abläuft.

8. Untersuchung der bei der UV-Bestrahlung von Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure in wässriger Lösung anfallenden Nebenprodukte.

Bei der UV-Bestrahlung von Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure entstehen neben dem reversiblen Wasser-Additionsprodukt eine Reihe von irreversiblen Umsetzungsprodukten. Es ist vor allem naheliegend, eine Desaminierung des Cytosin-Ringes zu diskutieren.

Eine derartige Desaminierung war von D.WEINBLUM (Lit. 44) beobachtet worden, der beim Bestrahlen von Cytosin in wässriger Lösung 1% Uracil nachweisen konnte. Wie Untersuchungen mit Tritium-markiertem Cytidin gezeigt haben, soll sich dieses analog verhalten.

M.DANIELS und A.GRIMISON (Lit. 45) fanden, daß Cytosin in wässriger Lösung zu Uracil desaminiert wird; sie geben jedoch weder Bestrahlungsdauer noch die Ausbeute an Uracil an. H.SCHUSTER (Lit. 43) beobachtete bei relativ langer Bestrahlung von Cytidin-3'-phosphorsäure in wässriger Lösung (Bestrahlungsdauer bis 68% Abnahme der Extinktion), daß in der Bestrahlungslösung 2.2% Uridin-3'-phosphorsäure nachzuweisen sind.

Die in der Literatur angegebenen Befunde weisen darauf hin, daß die Desaminierung nur bei relativ langer Bestrahlungsdauer und bei Verwendung kurzwelliger UV-Strahlung auftritt.

Um diese Annahme zu überprüfen, haben wir die Bestrahlung von Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure mit dem Niederdruckbrenner NK 25/7 in wässriger Lösung unter Verwendung des Filters aus 0.1 m KBr-Lösung durchgeführt.

Beim Bestrahlen einer 10^{-4} m Cytosinlösung (Bestrahlungsdauer 80 min; Abnahme der Extinktion 40%) erhielten wir nach dem Einengen am Rotationsverdampfer und der anschließenden papierchromatographischen Untersuchung 3 Flecke, die sich als Uracil (8%), Cytosin und eine unbekannte Substanz erwiesen. Letztere zeigt in 0.1 n HCl bei 264-269 nm ein flaches Maximum, bei 251-253 nm ein Minimum (Versuch 43a). Das molare Verhältnis an gefundenem Uracil und Cytosin beträgt 1:12.

Die analoge Bestrahlung einer 10^{-4} m Cytidinlösung (Bestrahlungsdauer 30 min; Abnahme der Extinktion 78%) ergab 2 Substanzen, die sich als Uridin (10%) und Cytidin erwiesen (Versuch 43b). Das molare Verhältnis an gefundenem Uridin und Cytidin beträgt 1:10.

Beim Bestrahlen einer 10^{-4} m Cytidylsäurelösung (Bestrahlungsdauer 45 min; Abnahme der Extinktion 63%) erhielten wir auf dem Papier nur einen fluoreszierenden Fleck, der sich als Cytidylsäure erwies. Jedoch ergab das Besprühen eines Papierchromatogramms in einem anderen System mit Anilinphtalat-Lösung (Reagenz auf Zucker und deren Derivate) einen rötlichen Fleck, der als abgespaltenes Ribose-phosphat identifiziert wurde (Versuch 43c).

Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von H.SCHUSTER (Lit. 43), der bei der längeren Bestrahlung von Cytidin-3'-phosphorsäure (70% Abnahme) anorganisches Phosphat nachweisen konnte.

9. Die UV-Bestrahlung von weiteren Nukleinsäure-Bestandteilen in wässriger Lösung.

9.1. Die UV-Bestrahlung von Thymin und Thymidin in wässriger Lösung.

Da bis heute noch nicht sicher geklärt werden konnte, ob die Bestrahlung von in 5-Stellung substituierten Uracilen in wässriger Lösung zu einem reversiblen Wasser-Additionsprodukt führt, haben wir als erstes Thymin (5-Methyl-uracil) in wässriger Lösung bestrahlt. Von diesem ist bekannt, daß es beim UV-Bestrahlen in gefrorener Lösung dimerisiert.

Dazu wurde von uns eine wässrige 10^{-4} m Thyminlösung mit dem Brenner NK 25/7 unter Verwendung des KBr-Filters solange bestrahlt, bis die Extinktion bei 265 nm um 5.2% abgenommen hatte. Beim Stehenlassen bei 20° stieg die Extinktion nach kurzer Zeit wieder um 4.5% an. Eine kinetische Untersuchung war jedoch nicht

möglich. Wir schätzen die Halbwertszeit des reversiblen Bestrahlungsproduktes des Thymins auf 1-2 Minuten (Versuch 44a).

In analoger Weise erhielten wir bei der Bestrahlung von Thymidin unter den gleichen Bedingungen (Bestrahlungsdauer 80 min; Abnahme der Extinktion bei 272 nm um 10.5%) einen Extinktionsanstieg von 3.5% auf 93% (Versuch 44b). Auch hier schätzen wir die Halbwertszeit des Zerfalls auf 1-2 Minuten.

Es ist also anzunehmen, daß auch Thymin und Thymidin in wässriger Lösung zur Bildung eines, allerdings sehr instabilen Wasser-Additionsproduktes befähigt sind [10].

9.2. Die UV-Bestrahlung von 1-Methyl-cytosin [11] in wässriger Lösung.

Die unterschiedliche Stabilität der reversiblen Bestrahlungsprodukte von Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure sowohl in wässriger ungepufferter als auch gepufferter Lösung (s. Tabelle 19) kann auf zweierlei Weise gedeutet werden:

1) Der Zucker-Rest im Cytidin wirkt durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierend auf das Wasser-Additionsprodukt [12].
2) Durch die Einführung des Zucker-Restes am N-1-Atom des Cytosins wird die Isomerisierbarkeit (Keto/Enol-Tautomerie) des Pyrimidin-Ringes verändert.

---

10) Von C.NOFRE und A.CIER (Lit. 46) ist kürzlich die Synthese des 6-Hydroxy-dihydrothymins (reversibles Bestrahlungsprodukt des Thymins) beschrieben worden. Die Autoren erhielten ein beständiges Produkt, ein Befund, der im Gegensatz zu den Ergebnissen aller anderen Bearbeiter steht.

11) Dargestellt nach Lit. 47.

Um die letztere Möglichkeit zu prüfen, untersuchten wir das Verhalten von 1-Methyl-cytosin bei der UV-Bestrahlung in wässriger Lösung. Da der eingeführte Methylrest keine Wasserstoffbrücken ausbilden kann, sollte die Verringerung oder Vergrößerung der Stabilität des Bestrahlungsproduktes einen Hinweis geben, ob die oben erwähnte Möglichkeit 2 eine Rolle spielt.

Zu diesem Zwecke bestrahlten wir 10^{-4} m wässrige Lösungen von 1-Methyl-cytosin mit dem Brenner NK 6/20 (mit KBr-Filter) und untersuchten den Zerfall des reversiblen Bestrahlungsproduktes in ungepufferter Lösung bei 20, 25 und 30°. Wir erhielten folgende Ergebnisse (Tab. 21; Vers. 45; Abb. 20).

Tabelle 21: UV-Bestrahlung von 1-Methyl-cytosin in ungepufferter wässriger Lösung. Kinetische Untersuchung des Zerfalls des reversiblen Bestrahlungsproduktes (Vers. 45).

t (°C)	$k \cdot 10^{+3}$ [min^{-1}]	τ [min]	1/T	log k + 3
20	7.4	94	0.00341	0.869
25	9.3	75	0.00336	0.968
30	18.6	37	0.00331	1.269

Der Vergleich mit den Werten des Cytosins (Tabelle 16) zeigt, daß mit Einführung eines Methylrestes am N-1-Atom des Cytosins die Stabilität des reversiblen Bestrahlungsproduktes abnimmt. Die Zunahme der Stabilität in der Reihe Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure kann also nicht durch die Änderung der Keto/Enol-

12) Siehe dazu die Diskussion bei G.DÖRHÖFER (Lit. 18); dort weitere Literatur.

tautomerie erklärt werden, sondern muß ein spezifischer Effekt des Ribose- bzw. Phosphor-ribose-Restes sein.

In Analogie zum Cytosin ergab die intensive Einwirkung von UV-Strahlung auf eine 10^{-4} m 1-Methyl-cytosinlösung (Brenner NK 25/7 mit KBr-Filter; Bestrahlungsdauer 180 min; Abnahme der Extinktion um 60%) bei der Chromatographie neben der Ausgangssubstanz nur einen neuen Fleck, der sich als 1-Methyl-uracil erwies und offensichtlich durch Desaminierung entstanden war (Versuch 46).

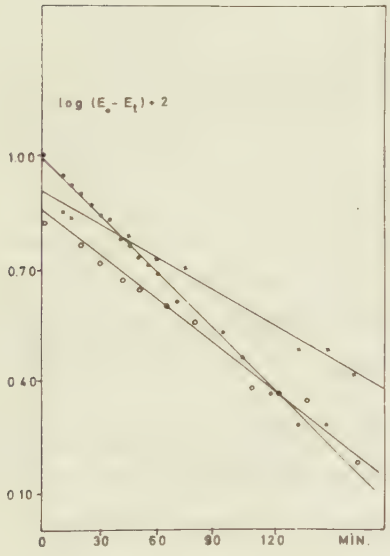
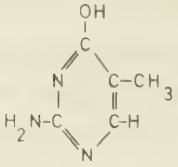


Abb. 20:

Zerfall des reversiblen Bestrahlungsproduktes des 1-Methyl-cytosins in ungepufferter wässriger Lösung.

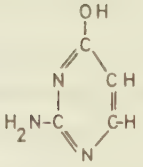
+ 20°
o 25°
• 30°

9.3. Die UV-Bestrahlung von 5-Methyl-i-cytosin und i-Cytosin in wässriger Lösung.



5-Methyl-i-cytosin

(24)



i-Cytosin

(25)

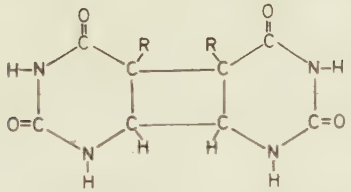
Die UV-Bestrahlung der beiden Pyrimidine (24) und (25) in wässriger Lösung führte auch unter den verschiedensten Bedingungen in keinem Falle zur Bildung eines nachweisbaren reversiblen Bestrahlungsproduktes (Vers. 47).

Dieses überraschende Ergebnis zeigt, daß die Bildung eines Wasser-Additionsproduktes nicht nur von sterischen Faktoren an der C=C-Bindung (Unterschied: Uracil - Thymin), sondern auch von anderen Gruppen im Molekül abhängt.

10. Die UV-Bestrahlung von Cytosin, Cytidin, Cytidylsäure und von anderen Pyrimidinen in gefrorener wässriger Lösung.

Bei der Bestrahlung der Pyrimidine in gefrorener wässriger Lösung erfolgt u.a. die Bildung dimerer Produkte, die z.B. beim Thymin und Uracil in Substanz dargestellt werden konnten (Lit. 30-32). Die Struktur des dimeren Uracils (26; R=H) konnte so-

wohl durch Abbau als durch Synthese bewiesen werden (Lit. 18).x)



I a: R=CH_3
b: R=H

(26)

Um das Verhalten des Cytosins, Cytidins und der Cytidylsäure näher zu untersuchen, bestrahlten wir wässrige gefrorene Lösungen [13] dieser Substanzen. Die Tabelle 22 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

Tabelle 22: Die UV-Bestrahlung von Cytosin, Cytidin und Cytidin-2'(3')-phosphorsäure in gefrorener Lösung (Vers. 48).

Pyrimidin	Konzentration	Abnahme der Extinktion (%)	Bestrahlungsdauer [Stdn]
Cytosin	$7 \cdot 10^{-2}$ m	28	1
Cytidin	$7 \cdot 10^{-2}$ m	25	2
Cytidylsäure	$7 \cdot 10^{-2}$ m	10	3/4

13) Die Frage, ob Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure in gefrorener wässriger Lösung Dimere bilden, ist in der Literatur umstritten (s. Lit. 32; 43 und 44).

x) Siehe dort weitere Literatur.

Bei der Papierchromatographie der aufgetauten Lösungen konnten wir in keinem Falle ein Dimeres durch nachträgliches Bestrahlen mit kurzwelligem UV nachweisen. Auch trat unter unseren Bestrahlungsbedingungen keine Desaminierung zu Uracil-Derivaten oder Abspaltung von Ribose- bzw. Ribose-phosphat auf (Vers. 48).

In gleicher Weise führte die Bestrahlung von 1-Methyl- und 5-Methyl-cytosin sowie von 5-Methyl-i- und i-Cytosin in gefrorener wässriger Lösung nicht zur Bildung von Dimeren, obwohl das 5-Methyl-cytosin in Analogie zum Thymin eine solche erwarten läßt. Lediglich im Falle des 5-Amino-uracils konnten wir nach einstündiger Bestrahlung (Abnahme der Extinktion um 18%) die Bildung eines Dimeren in 4% Ausbeute nachweisen (Versuch 49).

11. Die UV-Bestrahlung von Purin-Bestandteilen der Nukleinsäuren.

Im Gegensatz zu den Pyrimidin-Bestandteilen der Nukleinsäuren sind deren Purin-Bestandteile gegen UV-Strahlung relativ stabil. Ihre Photochemie ist deshalb wesentlich weniger bearbeitet worden (Lit. 48).

Wir erhielten bei der UV-Bestrahlung von Adenin, Adenosin und Adenylsäure in offenen Petri-Schalen mit dem Niederdruckbrenner NN 15/44 ohne Filter folgende Ergebnisse (Tabelle 23; Vers. 50).

In keinem Falle konnten beim Stehenlassen oder Erhitzen die Bildung eines reversiblen Bestrahlungsproduktes nachgewiesen werden, sodaß die Bildung eines Wasser-Additionsproduktes in der Adenin-Reihe auszuschließen ist. Die Chromatographie der eingeengten Bestrahlungslösungen lieferte im Falle des Adenins

und des Adenosins nur deren Flecke; bei der Adenylsäure konnte in einprozentiger Ausbeute die Bildung von Adenin nachgewiesen werden. Der Angriff der UV-Strahlung führte also zur Spaltung der N-glykosidischen Bindung.

Tabelle 23: UV-Bestrahlung von Adenin, Adenosin und Adenylsäure in wässriger Lösung (Versuch 50).

Purin	Bestrahlungsdauer [Stdn]	Konzentration	Abnahme der Extinktion (%)
Adenin	15	$2.2 \cdot 10^{-3}$ m	4
Adenosin	15	$1.2 \cdot 10^{-3}$ m	16
Adenylsäure	24	$2.0 \cdot 10^{-3}$ m	10

Da Guanin in Wasser zu schwer löslich ist, wurden das entsprechende Ribosid bzw. Ribotid in wässriger Lösung bestrahlt. Infolge der noch geringeren Quantenausbeuten als in der Adenin-Reihe sind die Bestrahlungseffekte noch geringer und erlauben nur bedingte Aussagen (Tabelle 24; Versuch 51).

Die Chromatographie lieferte im Falle des Guanosins neben nicht umgesetztem Guanosin etwas Guanin, jedoch keine freie Ribose. Im Falle der Guanylsäure erhielten wir nach 14 Stunden Bestrahlung zu 50% nicht umgesetzte Guanylsäure und 17% Guanosin. Ribose konnte nicht nachgewiesen werden.

Die papierchromatographische Untersuchung der Bestrahlungslösung von Guanylsäure beweist erneut die Fragwürdigkeit der in der Literatur häufig beschriebenen Bestimmung von Quantenausbeuten aus der Abnahme der Extinktion. Im vorliegenden Falle ergibt sich aus der direkten papier-

chromatographischen Guanylsäure-Bestimmung eine Guanylsäure-Abnahme von 50%, aus der Extinktionsabnahme (Tab. 24) dagegen nur von 22%, da das bei der photochemischen Reaktion entstehende Guanosin im gleichen Bereich absorbiert. Die aus der Extinktionsabnahme berechnete Quantenausbeute würde damit einen zu kleinen Wert liefern.

Tabelle 24: UV-Bestrahlung von Guanosin und Guanylsäure in wässriger Lösung (Versuch 51).

Purin	Bestrahlungsdauer [Stdn]	Konzentration	Abnahme der Extinktion (%)
Guanosin	6	$0.6 \cdot 10^{-4}$ m	25
Guanylsäure	3	$0.26 \cdot 10^{-4}$ m	5
Guanylsäure	14	$1.3 \cdot 10^{-4}$ m	22

12. Die Bestimmung der Quantenausbeute bei der UV-Bestrahlung ungepufferter wässriger Lösungen.

Die Bestimmung der Quantenausbeute erfolgte nach dem von D.SHUGAR (Lit. 49) angegebenen Verfahren (Vergleich mit der Quantenausbeute des Uridins: $21.6 \cdot 10^{-3}$ [Mol·Einstein^{-1}]). Die Quantenausbeute ist definiert

$$\text{Quantenausbeute (QA)} = \frac{\text{Zahl der reagierenden Moleküle}}{\text{Zahl der absorbierten Quanten}}$$

Die Bestimmung erfolgte nach der Gleichung [14]:

14) H.FROMMHERZ, "Physikalisch-chemisches Rechnen", Verlag Chemie, Weinheim 1956, Seite 245.

$$QA = \frac{1.196 \cdot 10^{16} \cdot n_r}{U_{ab} \cdot \lambda} \qquad \left[\text{Mol} \cdot \text{Einstein}^{-1}\right]$$

n_r = $(c_o - c) \cdot V$;

V = Volumen der Bestrahlungslösung in Liter;

c_o = Ausgangskonzentration in Mol/l;

c = Endkonzentration nach Beendigung der Bestrahlung in Mol/l;

λ = Wellenlänge in Å;

U_{ab} = absorbierte Lichtenergie in erg/min;

Mittels der bekannten Quantenausbeute des Uridins und der von uns vorgenommenen Bestrahlung von Uridin-lösungen bekannter Konzentration wurden nach obiger Formel zunächst U_{ab} unserer UV-Lampen (einschließlich KBr-Filter) bestimmt. Wir erhielten für unsere Niederdruckbrenner folgende Werte:

NK 6/20 : $U_{ab} = 1.20 \cdot 10^8$ erg/min;

NK 25/7 : $U_{ab} = 8.0 \cdot 10^8$ erg/min;

Mit diesen beiden Werten U_{ab} wurden die im folgenden angegebenen Quantenausbeuten nach der obigen Formel berechnet (Tab. 25).

Tabelle 25: Quantenausbeuten der von uns zur Bestrahlung verwandten Nukleinsäure-Bestandteile.

Substanz	Quantenausbeute $\left[\text{Mol/Einstein}^{-1}\right]$
Cytosin	$1.4 \cdot 10^{-3}$
Cytidin	$9.4 \cdot 10^{-3}$
Cytidylsäure	$6.1 \cdot 10^{-3}$
Adenosin	$0.018 \cdot 10^{-3}$
Guanosin	$0.270 \cdot 10^{-3}$

Die angegebenen QA-Werte haben insofern nur orientierenden Wert, da sich der photochemischen Reaktion (Addition von Wasser an die 5.6-Doppelbindung) die thermische Rückreaktion (Zerfall des Wasser-Additionsproduktes in die Ausgangsverbindung und Wasser), die beim Cytosin und seinen Derivaten relativ schnell verläuft (vgl. S.40), überlagert.

Vergleicht man die Quantenausbeuten von Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure, so zeigt sich, daß das Cytosin um den Faktor 5 bis 7 inaktiver ist als das Ribosid und Ribotid, obwohl der Ribose- bzw. Phosphor-ribose-Rest erst unterhalb 220 nm absorbiert und deshalb mit der UV-Strahlung selbst nicht reagiert. Es ist deshalb anzunehmen, daß der Ribose- bzw. Phosphor-ribose-Rest eine Aktivierung der 5.6-Doppelbindung, an der die photochemische Reaktion angreift, bewirkt.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Einige Nitrosamine zeigen ausgeprägte cancerogene Eigenschaften, deren Ursachen in der Literatur auf ihre Überführbarkeit in die entsprechenden Diazoalkane zurückgeführt werden. Wir konnten zeigen, daß die cancerogenen Nitrosamine mit Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure reagieren. Dagegen bleibt die Reaktion bei der Umsetzung dieser Pyrimidine mit nicht cancerogenen Nitrosaminen aus.

2. Obwohl wir den Mechanismus der Umsetzung der cancerogenen Nitrosamine mit Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure nicht aufklären konnten, ist jedoch anzunehmen, daß die Reaktion nicht über die intermediäre Bildung von NO^+-Ionen (bzw. anderer nitrosierender Teilchen) abläuft. So entsteht bei der Umsetzung von Cytidylsäure mit cancerogenen Nitrosaminen nicht die durch Desaminierung zu erwartende Uridylsäure, die bei der Umsetzung von Cytidylsäure mit salpetriger Säure in quantitativer Ausbeute erhalten wird. Weiter bildet sich bei der Umsetzung von Cytidin mit cancerogenen Nitrosaminen kein Stickstoff, der für eine Desaminierungs-Reaktion zu erwarten ist. Da die Umsetzung mit den cancerogenen Nitrosaminen eine freie NH_2-Gruppe voraussetzt (4-Methyl-cytosin sowie Uracilderivate reagieren nicht), vermuten wir, daß die cancerogenen Nitrosamine unmittelbar an der NH_2-Gruppe angreifen und daß dann eine Ringöffnung der Pyrimidin-Molekel erfolgt.

3. Der auffällige Unterschied im Verhalten der von uns untersuchten Nitrosamine gegenüber Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure, der mit der Cancerogenität der Nitrosamine in Korrelation steht, dürfte auf die unterschiedliche Raumerfüllung der Alkyl-Reste am Nitrosamin zurückzuführen sein. Die von uns ausgeführten Versuche beweisen, daß es zur Deutung der Cancerogenität bzw. Nicht-Cancerogenität der Nitrosamine nicht eines - zudem auch chemisch widersprüchlichen - Diazoalkan-Mechanismus bedarf. Sie machen weiter wahrscheinlich, daß der durch Nitrosamine verursachte Krebs durch eine chemische Reaktion zwischen dem Nitrosamin und einer freien NH_2-Gruppe ausgelöst wird, und daß damit die Krebsentstehung

auf spezifische chemische Reaktionen zurückgeführt werden kann. Da - wie wir zeigen konnten - auch Harnstoff (nicht dagegen symm. Dimethyl-harnstoff) mit den cancerogenen Nitrosaminen reagiert, müssen für die Krebsauslösung durch Nitrosamine außer der möglichen Reaktion mit dem Cytosin-Teil der DNS auch Umsetzungen der cancerogenen Nitrosamine mit NH_2-Gruppen z.B. in Eiweißstoffen u.a. in Betracht gezogen werden.

4. Im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen über das Verhalten von Nitrosaminen wurde auch die Umsetzung von Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure mit salpetriger Säure untersucht. Es entsteht jedoch nur bei der Umsetzung der Cytidylsäure ausschließlich Uridylsäure als Desaminierungsprodukt. Beim Cytosin bzw. Cytidin erfolgen dagegen neben der Desaminierung auch andere Reaktionen. Auch Uracil reagiert mit salpetriger Säure.

5. Purin-Bestandteile der Nukleinsäuren reagieren weder mit den cancerogenen noch mit den nicht cancerogenen Nitrosaminen. Bei der Umsetzung mit salpetriger Säure erhielten wir aus Adenosin und Guanosin allerdings nicht in quantitativer Ausbeute Inosin und Xanthosin.

6. Bei der UV-Bestrahlung von Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure unter Verwendung einer 0.1 m wässrigen KBr-Lösung als Filter entstehen reversible Bestrahlungsprodukte, deren 6-Hydroxy-dihydrocytosin-Struktur durch chemische Synthese bewiesen werden konnte.

7. Das Verhalten von Purinen und einiger anderer Pyrimidine (1-Methyl-, 5-Methyl-, iso- und 5-Methyl-i-cytosin sowie 5-Aminouracil bzw. Thymin und Thymidin) bei der UV-Bestrahlung in wässriger Lösung wurde untersucht.

II. EXPERIMENTELLER TEIL

Experimenteller Teil zum Teil A der Arbeit.

1. Allgemeine bei den Untersuchungen angewandte Methoden:

Die Umsetzungen erfolgten bei 30° in einem Wasserthermostaten. In den in den Tabellen angegebenen Abständen wurden Substanzproben entnommen und mit geeichten Pipetten (Volumen 0.01, 0.02 und 0.1 ml) auf das Chromatographiepapier (WHATMAN Nr.1) aufgetragen. Nach dem Entwickeln des Chromatogramms wurde das getrocknete Papier unter einer UV-Analysenlampe (Modell NN 15/44) der Fa. QUARZLAMPENGESELLSCHAFT HANAU untersucht, die gefundenen Flecke markiert und ausgeschnitten. Danach wurde mit einem entsprechenden Lösungsmittel eluiert. Um den Leerwert des Papiers zu eliminieren, wurde in gleicher Höhe ein ebenso großer Fleck ausgeschnitten und eluiert.

Die pH-Werte wurden mit einem pH-Meter der Fa. Dr. A.KUNTZE, Modell GKV 2 NP, mittels einer geeichten Glaselektrode vermessen.

Die spektroskopischen Untersuchungen erfolgten mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers, Modell DU, der Fa. BECKMAN in 10 mm Quarzküvetten.

Die gasvolumetrischen Messungen wurden in einer WARBURG-Apparatur der Fa. BRAUN, Melsungen, durchgeführt. Dabei fanden mit Quecksilber geeichte WARBURG-Gefäße und -Manometer Verwendung.

Die Auswertung der Kinetik wurde ausschließlich auf graphischem Wege vorgenommen. Die molaren Extinktionskoeffizienten der zur Umsetzung verwandten Substanzen wurden bis auf einige Fälle der Literatur entnommen (Tabelle 26).

Tabelle 26: Die molaren Extinktionskoeffizienten der zur Untersuchung verwandten Substanzen.

Substanz	pH-Wert	λ_{max} (nm)	$E \cdot 10^{-3}$	Lit.
Uracil	4.4-7.2	259	8.2	50
	0.1 n HCl	260	8.06	51
Cytosin	7.0	269	6.50	50
	0.1 n HCl	275	10.1	51
i-Cytosin	H_2O	286	42.5	x
1-Methyl-cytosin	H_2O	274	8.15	x
Thymin	2-7	264	7.8	52
Uridin	1-7	262	10.0	53
	0.1 n HCl	262	9.93	51
Cytidin	7.0	270	8.83	53
	0.1 n HCl	280	13.0	51
Thymidin	1-7.2	267	9.65	54
Uridin-2'(3')-phosphorsäure	7.0	262	10.04	55
	0.1 n HCl	262	9.89	51
Cytidin-2'(3')-phosphorsäure	5.5-7.0	272	10.0	x
	0.1 n HCl	280	12.95	56
Adenin	H_2O	260	13.2	57
Adenosin	7.0	259	15.40	58
	0.1 n HCl	260	14.20	51
Adenylsäure	H_2O	260	14.00	x
Guanosin	7.0	253	13.70	58
	0.1 n HCl	255	12.20	51
Inosin	0.1 n HCl	247	11.80	51
Xanthosin	0.1 n HCl	262	8.90	51

x = selbstermittelte Werte

Auswertung der kinetischen Messungen:

Die Auswertung erfolgte nach der in HOUBEN-WEYL: "Methoden der präparativen organischen Chemie", Bd.III/1 Seite 127 angegebenen Methode, bei der die RGK einer nach I. Ordnung ablaufenden Reaktion nach folgender Gleichung bestimmt wird:

$$k = \frac{2.303 \cdot (\log A_1 - \log A_2)}{(t_2 - t_1)}$$

In dieser Gleichung bedeuten A_1 bzw. A_2 die Konzentrationen zur Zeit t_1 bzw. t_2 in %.

Versuch 1: Die Umsetzung von Cytosin mit Dimethyl-nitrosamin [15,16] im molaren Verhältnis 1:200 bei 30°.

Lösung 1: 5.0 ml einer 0.5-proz. Cytosinlösung (0.225 mMol Cytosin) und 3.0 g (40.5 mMol) DMNA wurden mit Puffer des pH 4.0 auf 10 ml aufgefüllt; pH der Lösung 4.2 .

Lösung 2: Gleiche Mengen an Cytosin und DMNA wurden mit 50-proz. Essigsäure auf 10 ml aufgefüllt; pH der Lösung 3.0 .

Aus den bei 30° gehaltenen Lösungen wurde im Abstand von 10-12 Stunden eine Menge von 0.02 ml entnommen und auf WHATMAN Nr.1 Chromatographiepapier aufgetragen; Papierchromatographie: n-Pro-

15) Die Darstellung des Dimethyl-nitrosamins erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von H.HATT (Lit. 59).

16) Dimethyl-nitrosamin wird im folgenden mit DMNA abgekürzt.

panol/n-Butanol/Wasser (1:1:1) absteigend. Eluieren der Cytosinflecke (R_f 0.38) mit 5 ml Wasser 4 Stunden bei Raumtemperatur. Ergebnis der Kinetik: Tabelle 2, Seite 7 .

Versuch 2: Die Umsetzung von Cytidin mit DMNA im molaren Verhältnis 1:200 bei 30°.

Lösung 1: 15.0 ml einer 10^{-2} m Cytidinlösung (0.15 mMol Cytidin) und 2.0 g (30 mMol) DMNA wurden mit Puffer des pH 4.0 auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 4.2 .

Lösung 2: Gleiche Mengen an Cytidin und DMNA wurden mit 1 ml Eisessig und Wasser auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 3.0 .

Die Chromatographie und Aufarbeitung erfolgte wie in Versuch 1 beschrieben (Cytidin: R_f-Wert von 0.26).

Ergebnis der Kinetik: Tabelle 3, Seite 8 .

Versuch 3: Die Umsetzung von Cytidin-2'(3')-phosphorsäure (Cp) mit DMNA im molaren Verhältnis 1:400 und 1:200 bei 30°.

Lösung 1: 3.0 ml einer $4.5 \cdot 10^{-2}$ m Cp-Lösung (0.135 mMol Cp) und 4.0 g (54 mMol) DMNA (molares Verhältnis 1:400) wurden mit 1 ml Eisessig versetzt und mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 3.0 .

Lösung 2: 3.0 ml einer $4.5 \cdot 10^{-2}$ m Cp-Lösung (0.135 mMol Cp) und 2.0 g (27 mMol) DMNA (molares Verhältnis 1:200) wurden mit Puffer des pH 4.0 auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 4.2 .

Aus den Lösungen wurde im Abstand von 10-12 Stunden eine Probe entnommen und auf WHATMAN Nr.1 aufgetragen. Papierchromatographie:

i-Propanol/2 n HCl (65:35) absteigend. Eluieren der Flecke wie in Versuch 1 beschrieben.

Ergebnis der Kinetik: Tabelle 4, Seite 9 .

Versuch 4: Die Umsetzung der nicht cancerogenen Nitrosamine (1h) bis (1j) mit Cytidin im molaren Verhältnis 200:1 bei 30°.

36.45 mg (0.15 mMol) Cytidin wurden in einem 25 ml Meßkolben mit den unten aufgeführten Mengen an Nitrosaminen versetzt und mit 0.1 n HCl/Äthanol (1:1) auf 25 ml aufgefüllt.

1) 3.45 g (30 mMol) Methyl-t-butyl-nitrosamin [17]
2) 3.92 g (30 mMol) Di-i-propyl-nitrosamin [18]
3) 4.08 g (30 mMol) Methyl-phenyl-nitrosamin [19]
4) 1.60 g (7 mMol) Di-tolyl-nitrosamin [20]
5) 2.23 g (30 mMol) Dimethyl-nitrosamin [21]

Aus den bei 30° gehaltenen Lösungen wurden nach den in Tabelle 6 angegebenen Zeiten 0.1 ml entnommen und auf WHATMAN Nr.1 Chromatographiepapier aufgetragen. Im System n-Propanol/n-Butanol/Wasser (1:1:1) über Nacht entwickelt, wurden die Flecke des Cytidins (R_f 0.28) mit 0.1 n HCl 45 Minuten bei 45° eluiert und spektralphotometrisch vermessen.

Ergebnis: Die Änderung des Cytidin-Gehaltes (Mittelwert aus jeweils 4 Messungen) s. Tabelle 6, Seite 12 .

---

17) Dargestellt nach D.F.HEATH und A.R.MATTOCKS (Lit. 60).
18) Wir danken Herrn Dr. MANNSCHRECK, Organisch-chemisches Institut der Univ. Heidelberg, für die Überlassung einer Probe.
19) Dargestellt nach A.J.VOGEL (Lit. 61).
20) Infolge der geringen Löslichkeit mußten wir in verdünnterer Lösung arbeiten.
21) Der Versuch mit DMNA wurde als Kontrollversuch durchgeführt.

Versuch 5: Die Umsetzung von Dimethyl-nitrosamin mit anderen Pyrimidinen im molaren Verhältnis 200:1 bei 30°.

In einem 25 ml Meßkolben wurden jeweils 2.23 g (30 mMol) DMNA mit den unten angegebenen Pyrimidinen versetzt und mit 0.1 n HCl/Äthanol (1:1) auf 25 ml aufgefüllt.

1) 36.6 mg (0.15 mMol) Uridin
2) 16.8 mg (0.15 mMol) Uracil
3) 18.9 mg (0.15 mMol) Thymin
4) 18.8 mg (0.15 mMol) 5-Methyl-cytosin
5) 18.8 mg (0.15 mMol) 4-Methyl-cytosin
6) 18.8 mg (0.15 mMol) 4-Methyl-cytosin x)

x) Zur Kontrolle umgesetzt mit 3.45 g (30 mMol) nicht cancerogenem Methyl-t-butyl-nitrosamin.

Die in analoger Weise wie in Versuch 4 durchgeführten Messungen ergaben mit Ausnahme des 5-Methyl-cytosins keine Umsetzung.

Ergebnis: Tabelle 7, Seite 13 .

Versuch 6: Die Umsetzung verschiedener Nitrosamine mit Harnstoff im molaren Verhältnis 1:400 bei 30°.

12.0 g (0.2 Mol) Harnstoff wurden jeweils in einem 100 ml Meßkolben mit den unten angegebenen Mengen an Nitrosamin versetzt und mit einer Mischung an 0.1 n HCl/Äthanol (1:1) auf 100 ml aufgefüllt.

1) 59.4 mg (0.5 mMol) Diäthyl-nitrosamin [22]
2) 63.4 mg (0.5 mMol) Methyl-phenyl-nitrosamin
3) 24.0 mg (0.1 mMol) Di-tolyl-nitrosamin [20]

---

22) Dargestellt nach A.J.VOGEL (Lit. 62).

4) 57.7 mg (0.5 mMol) Methyl-t-butyl-nitrosamin

5) 40.0 mg (0.5 mMol) DMNA

6) 52.1 mg (0.5 mMol) N-Nitroso-piperidin [23)]

7) 66.0 mg (0.5 mMol) Di-i-propyl-nitrosamin.

Aus den bei 30° gehaltenen Lösungen wurden im Abstand von 8-12 Stunden Proben entnommen und der Gehalt an Nitrosamin spektralphotometrisch gegen eine Küvette mit der gleichen Menge an Harnstoff in 0.1 n HCl/Äthanol (1:1) vermessen.
Ergebnis der Kinetik: Tabelle 8 und Abbildung 4, Seite 15 .

Versuch 7: Die Umsetzung cancerogener Nitrosamine mit symm. Dimethylharnstoff [24)] im molaren Verhältnis 1:300 bei 30°.

Lösung 1: 39.4 mg (0.35 mMol) Diäthyl-nitrosamin wurden in einem 50 ml Meßkolben mit 8.8 g (0.1 Mol) symm. Dimethylharnstoff versetzt und mit 0.1 n HCl/Äthanol (1:1) auf 50 ml aufgefüllt.

Lösung 2: 21.5 mg (0.33 mMol) DMNA wurden in einem 50 ml Meßkolben mit der gleichen Menge an symm. Dimethylharnstoff versetzt und auf 50 ml aufgefüllt.

Lösung 3: 25.0 mg (0.33 mMol) N-Nitroso-piperidin wurden in analoger Weise wie Lösung 1 und 2 mit symm. Dimethylharnstoff und 0.1 n HCl/Äthanol (1:1) auf 50 ml aufgefüllt.

Aus den bei 30° gehaltenen Lösungen wurde wie in Versuch 6 beschrieben im Abstand von 8-12 Stunden Proben spektralphotometrisch vermessen.

Ergebnis: Innerhalb von 80 Stunden keine Umsetzung.

---

23) Dargestellt nach L.KNORR (Lit. 63).

Versuch 8: Die Umsetzung von Cytosin mit salpetriger Säure bei 30°.

Lösung 1: 3.0 ml einer 0.5-proz. Cytosinlösung (0.136 mMol Cytosin) und 3.73 g (54.4 mMol) Natriumnitrit wurden mit 11 ml Eisessig versetzt und mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 4.2 .

Lösung 2: Gleiche Mengen an Cytosin und Natriumnitrit wie in Lösung 1 wurden mit 4.5 ml Puffer versetzt und mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 6.1 .

Lösung 3: 3.0 ml einer 0.5-proz. Cytosinlösung (0.136 mMol Cytosin) und 1.86 g (27.2 mMol) Natriumnitrit (molares Verhältnis 1:200) wurden mit 4 ml Puffer versetzt und mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 6.1 .

Lösung 4: Gleiche Mengen an Cytosin und Natriumnitrit wie in Lösung 3 wurden mit 4 ml Eisessig versetzt und mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 4.2 .

Aus den bei 30° gehaltenen Lösungen wurden im Abstand von 10-12 Stunden 0.02 ml entnommen und chromatographiert. Papierchromatographie: n-Propanol/n-Butanol/Wasser (1:1:1) absteigend. Eluieren der Flecke mit 5 ml Wasser 4 Stunden bei Raumtemperatur.
Cytosin: R_f 0.38; Uracil: R_f 0.48 .

Ergebnis der Kinetik: Tabelle 9, Seite 18 .

---

24) Infolge der geringen Löslichkeit des symm. Dimethylharnstoffs in diesem Lösungsmittel-Gemisch, mußten wir das molare Verhältnis verringern.

Versuch 9: Die Umsetzung von Cytosin mit Natriumnitrit im molaren Verhältnis 1:400 im Verlauf von 5 Stunden bei 30°.

Lösung 1: 30.0 ml einer 0.1-proz. Cytosinlösung (0.272 mMol Cytosin) wurden nach Zugabe von 7.45 g (109 mMol) Natriumnitrit mit Eisessig auf 50 ml aufgefüllt; pH der Lösung 4.2 .

Aus der bei 30° gehaltenen Lösung wurde im Abstand von 0.5 Stunden eine Menge von 0.02 ml aufgetragen und chromatographiert. Chromatographie und Aufarbeitung erfolgten wie in Versuch 8 beschrieben (Uracil: R_f 0.48).

Ergebnis der Kinetik: Tabelle 10, Seite 19 .

Versuch 10: Die Umsetzung von Uracil mit Natriumnitrit im molaren Verhältnis 1:400 und 1:200 bei 30°.

Lösung 1: 6.0 ml einer $2.25 \cdot 10^{-2}$ m Uracillösung (0.135 mMol Uracil) und 3.74 g (54.8 mMol) Natriumnitrit (molares Verhältnis 1:400) wurden mit 14 ml Eisessig versetzt und Wasser auf 25 ml zugegeben; pH der Lösung 4.2 .

Lösung 2: Gleiche Mengen an Uracil und Natriumnitrit wie in Lösung 1 und 4.0 ml Puffer wurden mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 5.5 .

Lösung 3: 6.0 ml einer $2.25 \cdot 10^{-2}$ m Uracillösung (0.135 mMol Uracil) und 1.86 g (27.2 mMol) Natriumnitrit (molares Verhältnis 1:200) wurden mit 7.0 ml Eisessig versetzt und Wasser auf 25 ml zugegeben; pH der Lösung 3.6 .

Die Untersuchung des Systems erfolgte wie in Versuch 8 beschrieben; R_f von Uracil 0.48 . - Ergebnis der Kinetik : Tabelle 11, S. 21 .

Versuch 11: Die Umsetzung von Cytidin mit salpetriger Säure bei 30°.

Lösung 1: 15 ml einer 10^{-2} m Cytidinlösung (0.15 mMol Cytidin) und 1.86 g (27.2 mMol) Natriumnitrit (molares Verhältnis 1:200), versetzt mit 5.0 ml Eisessig, wurden mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 4.2 .

Lösung 2: Gleiche Mengen an Cytidin und Natriumnitrit wie in Lösung 1; mit Puffer wurde die Lösung auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 5.5 .

Aus den Reaktionslösungen wurden alle 10-12 Stunden 0.02 ml entnommen und chromatographiert; Papierchromatographie: n-Propanol/n-Butanol/Wasser (1:1:1) absteigend. Die Flecke wurden mit 5 ml Wasser 4 Stunden bei Raumtemperatur eluiert.
Gefundene R_f-Werte: Cytidin 0.26; Uridin 0.36 .

Ergebnis der Kinetik: Tabelle 12, Seite 22 .

Versuch 12: Die Umsetzung von Cytidin-2'(3')-phosphorsäure (Cp) mit salpetriger Säure bei 30°.

Lösung 1: 3.0 ml einer $4.5 \cdot 10^{-2}$ m Cp-Lösung (0.135 mMol Cp) und 1.86 g (27.2 mMol) Natriumnitrit (molares Verhältnis 1:200), versetzt mit 4.5 ml Eisessig, wurden mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 4.2 .

Lösung 2: 3.0 ml einer $4.5 \cdot 10^{-2}$ m Cp-Lösung (0.135 mMol Cp) und 3.73 g (54.4 mMol) Natriumnitrit (molares Verhältnis 1:400), versetzt mit 14.0 ml Eisessig, wurden mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 4.2 .

Aus den bei 30° gehaltenen Lösungen wurden im Abstand von 10-12 Stunden 0.02 ml entnommen und chromatographiert; Papierchromato-

graphie: i-Propanol/2 n HCl (65:35) absteigend. Mit 5 ml Wasser wurden die gefundenen Flecke in der in Versuch 11 beschriebenen Weise eluiert.

Ergebnis: Ausschließlich Bildung von Uridylsäure (R_f 0.72).

Versuch 13: Gasvolumetrische Untersuchung der Umsetzung cancerogener Nitrosamine mit Nukleinsäurebestandteilen.

$$\text{Gefäßkonstante } k = \frac{(V_{ges} - V_{fl}) \cdot \left(\frac{273}{273+t} + \alpha \cdot V_{fl} \right)}{10}$$

V_{ges} = Gesamtvolumen der Reaktionsgefäße (Tabelle A);

V_{fl} = " in ml aller in das Gefäß einpipettierten Lösungen;

t = Temperatur (^{o}C) des Thermostaten;

α = Bunsenscher Adsorptionskoeffizient (ml Gas, gelöst in 1 ml Lösung bei 1 atm Gasdruck und der Temperatur t ^{o}C; Tab. B);

Tabelle A: Volumina der WARBURG-Gefäße und -Manometer (ml):

Gefäß	Manometer-Nr.	Gefäß-Nr.	ml
1	1141	3016	15.69
2	1171	3006	16.40
3	1212	3015	16.77
4	1147	3003	15.74
5	1161	3056	15.03
6	1136	3058	14.34
7	1027	3000	15.82

Tabelle B: Bunsenscher Adsorptionskoeffizient bei 25^{o} x).

Lösungsmittel	
2 m H_2SO_4	0.669
0.5 m HCl	0.738
H_2O	0.759

x) Werte nach D'ANS - LAX: "Taschenbuch für Chemiker und Physiker", Springer-Verlag Berlin 1949, Seite 974 .

Abgelesen wird die Volumenänderung (in mm) im Reaktionsgefäß (linker Schenkel h_1) und verglichen mit der Änderung des Thermobarometers (rechter Schenkel DTB). Es ergibt sich nach folgendem Schema die Zunahme oder Abnahme der Reaktionslösung (mm) h_2:

linker Schenkel h_1	rechter Schenkel (DTB)	h_2
Zunahme um a (mm)	Abnahme um b (mm)	a+b (mm)
Abnahme " "	Zunahme " "	a+b
Zunahme " "	Zunahme " "	a-b
Abnahme " "	Abnahme " "	a-b

$dV\ (\mu l) = k \cdot h_2$; dV = Gasvolumenänderung bei 0^{o} und 1 atm Druck;

Zunächst stellten wir folgende Lösungen her:

Lösung 1: 257.4 mg (3.6 mMol) DMNA wurden in 10 ml 0.1 n HCl/Äthanol (1:1) gelöst;

Lösung 2: 671.4 mg (11.2 mMol) Harnstoff wurden in der gleichen Menge des Lösungsmittels gelöst;

Lösung 3: 608.9 mg (2.5 mMol) Cytidin wurden in analoger Weise gelöst;

Lösung 4: 807.9 mg (11 mMol) DMNA wurden in gleicher Weise gelöst.

Die Reaktionsgefäße wurden wie folgt angesetzt:

Gefäß 1: Als Thermobarometer mit 1.6 ml 0.1 n HCl/Äthanol (1:1) gefüllt;

Gefäß 2: 1 ml Lösung 1 und 0.3 ml Lösung 2 sowie 0.3 ml 0.1 n HCl/EtOH;

Gefäß 3: Gleiche Lösung wie in Gefäß 2;

Gefäß 4: Gleiche Lösung wie in Gefäß 2 und 3, dazu 0.3 ml 2 n NaOH im WARBURG-Einsatz;

Gefäß 5: 1 ml Lösung 3, 0.3 ml Lösung 4 und 0.3 ml 0.1 n HCl/EtOH;

Gefäß 6: Gleiche Lösung wie in Gefäß 5;

Gefäß 7: Gleiche Lösung wie in Gefäß 5 und 6, dazu 0.3 ml 2 n NaOH im WARBURG-Einsatz.

Nach 100 Stunden Reaktionszeit bei 30° unter Schütteln ergab sich folgender Stand:

Gefäß 1:	DTB	-1.1 (mm);	Gefäß 5:	h_2	-6.2 (mm);
" 2:	h_2	-0.2 "	" 6:	h_2	-2.5 "
" 3:	h_2	+0.8 "	" 7:	h_2	-6.8 "
" 4:	h_2	-3.4 "			

Durch Papierchromatographie der Reaktionslösung im Gefäß 5 wurde im System n-Propanol/n-Butanol/Wasser (1:1:1) eine Abnahme des Cytidins von 37% festgestellt.

Versuch 14: Gasvolumetrische Untersuchung der Umsetzung von Cytosin mit DMNA im molaren Verhältnis 1:10 bei Raumtemperatur.

2.0 g ($1.8 \cdot 10^{-2}$ Mol) Cytosin wurden mit 13.5 g (0.18 Mol) DMNA getrennt in das Zweischenkel-Gefäß einer Gasbürette (Volumen 100 ml) gebracht. Als Lösungsmittel wurden 70 ml 0.1 n HCl/Äthanol (1:1) benutzt. Das Zweischenkel-Gefäß wurde 200 Stunden geschüttelt, ohne daß eine Gasentwicklung gemessen wurde; nach dieser Zeit wurde die Reaktionslösung zur Trockne eingeengt und der verbleibende gelbe Rückstand mit 2 mal 40 ml Athanol extrahiert. Der Extrakt, der viel nicht umgesetztes Cytosin enthielt, wurde erneut zur Trockne eingeengt und mit 2 mal 20 ml n-Butanol extrahiert. In der Butanol-Phase war ein gelbes Öl vorhanden, das nicht gereinigt und identifiziert werden konnte.

Versuch 15: Gaschromatographische Bestimmung der bei der Umsetzung von cancerogenen Nitrosaminen mit Cytosin entstehenden sekundären Amine.

Sämtliche Untersuchungen wurden mit dem Gaschromatographen GC-2 der Fa. BECKMAN durchgeführt (Eichkurve: s. Abb. 21 x)).

Säule: Silikon 17 449;

Wasserstoffdruck: 30 psi;

Empfindlichkeit: 1;

Temperatur im Gaschromatograph: 70° C;

Detektor-Strom: 350 mA;

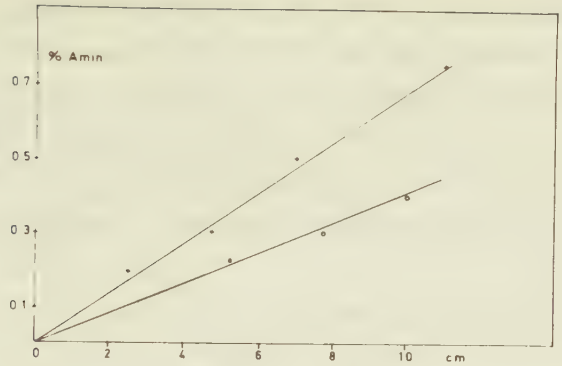


Abb. 21: Eichkurve für die Bestimmung der bei der Umsetzung von cancerogenen Nitrosamine mit Cytosin entstehenden Amine.

\+ Diäthyl-amin x)

o Dimethyl-amin x)

x) Die Eichlösungen für Dimethyl-amin wurden aus Dimethylamin-hydrochlorid wie für die Reaktionsansätze beschrieben dargestellt; die für Diäthyl-amin wurden direkt eingewogen.

Bestimmung der Proben:

Lösung 1: In einem 50 ml Meßkolben wurden 4.46 g (0.06 Mol) DMNA mit 33.3 mg (0.3 mMol) Cytosin (molares Verhältnis 200:1) versetzt und mit 0.1 n HCl/Äthanol (1:1) auf 50 ml aufgefüllt.

Lösung 2: 6.5 ml (0.06 Mol) Diäthyl-nitrosamin wurden in analoger Weise mit 33.3 mg (0.3 mMol) Cytosin versetzt und mit dem obigen Lösungsmittel auf 50 ml aufgefüllt.

Nach 180 Stunden wurden die bei 30° gehaltenen Lösungen zur Trockne abrotiert und die Rückstände mehrere Tage sorgfältig im Exsiccator getrocknet. Die gesammelten Rückstände wurden in einem 2 ml Meßkolben mit 0.1 ml einer hochkonzentrierten NaOH-Lösung versetzt und mit Toluol auf 2 ml aufgefüllt. Von diesen Lösungen wurden zur gaschromatographischen Bestimmung je 0.05 ml eingespritzt.

Ergebnis: Siehe Tabelle 13, Seite 25 .

Versuch 16: Bestimmung des Zerfalls von 3.3-Dimethyl-1-phenyl-triazen [25] in 0.1 n HCl/Äthanol (1:1) bei 30° (Tab. 27).

Tabelle 27: Spektroskopische Bestimmung des Zerfalls von 3.3-Dimethyl-1-phenyl-triazen bei 264 nm (10^{-5} m Lösung; Abbildung 5, Seite 28).

t (min)	E_t	A_t	log A_t
0	0.419	100	2.000
5	0.387	92.4	1.966
10	0.380	90.7	1.958
20	0.355	84.4	1.928
30	0.335	80.0	1.903
40	0.318	75.9	1.880
50	0.300	71.6	1.855
60	0.285	68.0	1.834
70	0.270	64.5	1.809
80	0.255	60.8	1.784
90	0.243	58.0	1.764
100	0.229	54.7	1.738
110	0.218	52.0	1.716
120	0.206	49.3	1.693
130	0.196	46.8	1.670
140	0.186	44.4	1.647
150	0.177	42.2	1.625

$$k = \frac{2.303 \cdot (1.975 - 1.600)}{(158 - 0)} = 5.5 \cdot 10^{-3} \left[\text{min}^{-1}\right]$$

$$\tau = 130 \left[\text{min}\right]$$

---

25) Dargestellt nach Lit. 19 .

Versuch 17: Isolierung von Umsetzungsprodukten aus der Reaktion von Cytosin bzw. Uracil mit salpetriger Säure.

1.5 g (0.014 Mol) Cytosin wurden mit 94 g (1.36 Mol) Natriumnitrit (molares Verhältnis 1:100) versetzt und in 250 ml Wasser gelöst. Zur Lösung wurden bei Raumtemperatur 100 ml HCl zugetropft und 60 Stunden bei 30° gehalten (pH der Lösung 4.2). Danach wurde das Reaktionsgemisch mit Ammoniak neutralisiert und mit 200 ml einer gesättigten Pikrinsäure-Lösung (ca. 0.02 Mol Pikrinsäure) versetzt. Es fiel sofort ein gelber Niederschlag aus, der nach 12 Stunden Stehen bei 0° abgesaugt und mehrere Male aus Äthanol umkristallisiert wurde.

Ausbeute: 0.9 g; Schmp. 281°;

Elementaranalyse: C 26.90%; H 1.67%; N 15.4%;

Das gleiche Produkt wurde bei der Umsetzung von 1.2 g (7.9 mMol) 4-Acetyl-cytosin [26] mit 44 g (0.64 Mol) Natriumnitrit (molares Verhältnis 1:40) in 300 ml 0.1 n HCl/Äthanol (1:1) und bei der Umsetzung von 1.52 g (0.014 Mol) Uracil mit 94 g (1.36 Mol) Natriumnitrit beim pH 4.2 erhalten.

Versuch 18: Die Umsetzung von Adenosin und Guanosin mit Natriumnitrit im molaren Verhältnis 1:200 bei 30°.

Lösung 1: 36.1 mg (0.135 mMol) Adenosin und 1.86 g (27.2 mMol) Natriumnitrit, versetzt mit 4.5 ml Eisessig, wurden mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 4.2 .

---

26) Dargestellt nach D.M.BROWN und A.TODD (Lit. 64).

Lösung 2: 38.2 mg (0.135 mMol) Guanosin und 1.86 g (27.2 mMol) Natriumnitrit, versetzt mit 4.5 ml Eisessig, wurden mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 4.2 .

Aus den bei 30° gehaltenen Lösungen wurden im Abstand von 10-12 Stunden 0.02 ml auf WHATMAN Nr.1 aufgetragen und entwickelt. Papierchromatographie: 5-proz. wässrige Na_2HPO_4/i-Amylalkohol (2:1) absteigend. Die Flecke wurden mit 5 ml 0.1 n HCl 45 Minuten bei 45° eluiert. Gefundene R_f-Werte: Inosin (Hypoxanthin) 0.69; Xanthosin 0.62 .

Ergebnis der Kinetik: Tabelle 15, Seite 33 .

Versuch 19: Die Umsetzung von Adenosin und Guanosin mit DMNA im molaren Verhältnis 1:400 bei 30°.

Lösung 1: 36.1 mg (0.135 mMol) Adenosin und 4.0 g (54 mMol) DMNA wurden mit Puffer des pH 4.0 auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 4.2 .

Lösung 2: 38.2 mg (0.135 mMol) Guanosin und 4.0 g (54 mMol) DMNA wurden mit Puffer des pH 4.0 auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 4.2 .

Lösung 3: Gleiche Mengen an Adenosin und DMNA wie in Lösung 1, versetzt mit 1 ml Eisessig, wurden mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 3.0 .

Lösung 4: Gleiche Mengen an Guanosin und DMNA wie in Lösung 2, versetzt mit 1 ml Eisessig, wurden mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt; pH der Lösung 3.0 .

Die Papierchromatographie und Aufarbeitung erfolgte wie in Versuch 18 beschrieben. - Gefundene R_f-Werte: Adenosin 0.47; Guanosin 0.54 .

Experimenteller Teil zum Teil B der Arbeit:

Bestrahlungsmethoden.

Zur Bestrahlung wurden Quecksilber-Niederdruck-Lampen der Typen NK 6/20, NK 25/7 (Kapillarbrenner) und NN 15/44 (Analysen-Lampe) der Fa. QUARZLAMPENGESELLSCHAFT HANAU verwandt, die in den beiden ersten Fällen von einem mit wässriger 0.1 m KBr gefüllten Mantel umgeben waren (Schichtdicke der Lösung: 1 cm). Die Bestrahlungen erfolgten in allen Fällen bei Raumtemperatur.

Kinetische Methoden zur Bestimmung der RGK (k) und der Halbwertszeit τ des Zerfalls der reversiblen Bestrahlungsprodukte.

Der Zerfall der reversiblen Bestrahlungsprodukte wurde spektralphotometrisch in einem Spektralphotometer, Modell DU, der Fa. BECKMAN in temperierbaren Küvetten verfolgt. Die Bestimmung der RGK wurde graphisch ausgeführt; dazu wurde log (E_o-E_t) gegen die Zeit aufgetragen und aus der Geraden die RGK berechnet [27].

Es ergibt sich die RGK nach folgender Gleichung:

$$RGK \equiv k = \frac{\log (E_o-E_1) - \log (E_o-E_2)}{(t_2-t_1) \cdot 0.4343} \qquad \left[min^{-1}\right]$$

und die Halbwertszeit τ

$$\tau = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0.69315}{k} \qquad \left[min\right]$$

27) Vgl. dazu H.FROMMHERZ, "Physikalisch-chemisches Rechnen", Verlag Chemie, Weinheim 1956, Seite 248 .

Dabei gilt für die obige Gleichung und die folgenden Tabellen:

c_o = Anfangskonzentration des eingesetzten Pyrimidins

E = Extinktion der Lösung vor der Bestrahlung

E_t = " " " nach " " zur Zeit t

E_o = Extinktion der bestrahlten Lösung nach Umwandlung des reversiblen Bestrahlungsproduktes in die Ausgangsverbindung

u_b = Abnahme der Extinktion des eingesetzten Pyrimidins während der Bestrahlung (%) am Maximum

u_h = vorhandene Ausgangssubstanz (%) nach Beendigung der Umwandlung des reversiblen Bestrahlungsproduktes

Wir schätzen die Fehlergrenze der kinetischen Bestimmung auf ungefähr ± 5%; dementsprechend sind alle kGK und τ-Werte abgerundet worden.

Versuch 20:

Tabelle 28: Zerfall des 6-Hydroxy-dihydrocytosins in ungepufferter Lösung bei 20^{o} (Abb. 9)

c_o (Cytosin): $0.89 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 45 min;

$E = 0.580$ $u_b = 19\%$

$E_o = 0.565$ $u_h = 97\%$

t [min]	$E_o - E_t$	log $(E_o - E_t)$
0	0.095	0.978-2
15	0.086	0.934-2
75	0.070	0.845-2
90	0.066	0.819-2
120	0.063	0.799-2
150	0.060	0.778-2
190	0.054	0.732-2
210	0.051	0.707-2
240	0.049	0.690-2
270	0.048	0.681-2
300	0.046	0.663-2

$$k = \frac{0.902 - 0.600}{(399 - 0) \cdot 0.4343} \cong 2.0 \cdot 10^{-3} \ [\text{min}^{-1}]$$

$\tau \cong 350$ [min]

Versuch 21:

Tabelle 29: Zerfall des 6-Hydroxy-dihydrocytosins in ungepufferter Lösung bei 25° (Abb. 9)

c_o (Cytosin): $1.30 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 50 min;

$E = 0.842$ $u_b = 21\%$

$E_o = 0.773$ $u_h = 92\%$

t [min]	$E_o - E_t$	log $(E_o - E_t)$
0	0.108	0.033-1
15	0.097	0.987-2
30	0.090	0.954-2
45	0.081	0.908-2
60	0.074	0.869-2
75	0.072	0.857-2
90	0.063	0.799-2
105	0.060	0.778-2
120	0.053	0.724-2
135	0.052	0.716-2
150	0.051	0.707-2
245	0.032	0.505-2
270	0.027	0.431-2
300	0.027	0.431-2
330	0.020	0.301-2

$$k = \frac{1.015 - 0.300}{(338 - 0) \cdot 0.4343} \cong 4.9 \cdot 10^{-3} \left[\text{min}^{-1}\right]$$

$\tau \cong 140$ [min]

Versuch 22:

Tabelle 30: Zerfall des 6-Hydroxy-dihydrocytosins in ungepufferter Lösung bei 30^{o} (Abb. 9)

c_o (Cytosin): $0.74 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 45 min;

$E = 0.480$ $u_b = 17\%$

$E_o = 0.462$ $u_h = 96\%$

t [min]	$E_o - E_t$	$\log (E_o - E_t)$
0	0.064	0.811-2
5	0.062	0.783-2
10	0.054	0.732-2
15	0.052	0.716-2
30	0.042	0.623-2
45	0.040	0.602-2
60	0.034	0.532-2
75	0.029	0.463-2
90	0.029	0.463-2
105	0.024	0.380-2
120	0.023	0.362-2
135	0.016	0.204-2
150	0.016	0.204-2

$$k = \frac{0.743 - 0.200}{(162 - 0) \cdot 0.4343} \cong 7.9 \cdot 10^{-3} \ [\text{min}^{-1}]$$

$$\tau \cong 90 \ [\text{min}]$$

Versuch 23:

Tabelle 31: Zerfall des 6-Hydroxy-dihydrocytosins in gepufferter Lösung bei 20° und pH 7.4 (Abb. 11)

100 ml der Bestrahlungslösung wurden nach Beendigung der Bestrahlung mit 358.2 mg (1.0 mMol) $Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$ versetzt; pH der Lösung 7.4;

c_o (Cytosin): $1.2 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 50 min;

$E = 0.774$ $u_h = 99.8\%$

$E_o = 0.771$

t [min]	$E_o - E_t$	$\log (E_o - E_t)$
3	0.111	0.045-1
5	0.111	0.045-1
15	0.100	0.000-1
30	0.088	0.944-2
45	0.075	0.875-2
60	0.069	0.839-2
75	0.057	0.756-2
90	0.050	0.699-2
105	0.036	0.556-2
120	0.031	0.491-2
135	0.027	0.431-2
150	0.023	0.362-2
165	0.016	0.204-2
180	0.016	0.204-2

$$k = \frac{1.092 - 0.320}{(160 - 0) \cdot 0.4343} \cong 1.11 \cdot 10^{-2}\ [\text{min}^{-1}]$$

$\tau \cong 62$ [min]

Versuch 24: Versuche zur Synthese des 6-Hydroxy-dihydrocytosins.

Zu einer Lösung von 28.0 mg (0.25 mMol) Cytosin in 20 ml Wasser wurden unter gutem Rühren bei Raumtemperatur solange 0.01 m Bromwasser gegeben, bis über längere Zeit (10 min) eine positive Reaktion mit KJ/Stärke eintrat. Die spektroskopische Untersuchung zeigte, daß in der Lösung 31% des eingesetzten Cytosins umgesetzt worden waren. Danach wurde die Bromierungslösung mit 0.3 g $BaCO_3$ und 0.5 g frischem Raney-Nickel versetzt, mit Wasser auf 140 ml verdünnt und 35 Minuten bei Raumtemperatur hydriert. Die so erhaltene filtrierte Lösung zeigte beim Stehen keine Extinktionszunahme; erhitzte man sie 10 Minuten auf 80°, so stieg die Extinktion des Maximum bei 265 nm um 7% an.

Die Hydrierungslösung wurde am Rotationsverdampfer auf 5 ml eingeengt und davon 0.08 ml auf WHATMAN Nr.1 aufgetragen. Im System n-Propanol/n-Butanol/Wasser (1:1:1) absteigend erhielten wir 2 Flecke: R_f 0.41 und R_f 0.50 . Der erste entsprach dem Cytosin, der zweite dem Uracil. Setzt man das auf dem Papier gefundene Cytosin (76% der eingesetzten Menge) mit 100% an, so berechnet sich die gefundene Uracil-Menge zu ca. 0.3%.

Versuch 25:

Tabelle 32: Zerfall des 6-Hydroxy-dihydrocytidins in ungepufferter Lösung bei 20° (Abb. 12)

c_o (Cytidin): $0.87 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 15 min;

E = 0.768 u_b = 44%

E_o = 0.710 u_h = 93%

t [min]	$E_o - E_t$	log $(E_o - E_t)$
0	0.282	0.448-1
30	0.262	0.417-1
60	0.247	0.393-1
90	0.232	0.365-1
120	0.220	0.343-1
150	0.208	0.318-1
220	0.180	0.255-1
240	0.174	0.241-1
270	0.161	0.207-1
300	0.153	0.185-1
330	0.143	0.155-1
360	0.134	0.127-1

$$k = \frac{0.449 - 0.120}{(372 - 0) \cdot 0.4343} \cong 2.0 \cdot 10^{-3} \ [\text{min}^{-1}]$$

$$\tau \cong 340 \ [\text{min}]$$

Versuch 26:

Tabelle 33: Zerfall des 6-Hydroxy-dihydrocytidins in ungepufferter Lösung bei 25° (Abb. 12)

c_o (Cytidin): $0.99 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 15 min;

E = 0.878 u_b = 40%

E_o = 0.809 u_h = 92%

t [min]	$E_o - E_t$	log $(E_o - E_t)$
0	0.281	0.449-1
15	0.264	0.422-1
75	0.208	0.318-1
90	0.193	0.268-1
105	0.181	0.258-1
120	0.171	0.233-1
135	0.165	0.217-1
150	0.150	0.176-1
165	0.147	0.167-1
180	0.138	0.140-1
195	0.131	0.117-1
210	0.120	0.079-1
225	0.115	0.061-1
240	0.110	0.041-1
255	0.104	0.017-1
270	0.098	0.991-2

$$k = \frac{0.438 - 0}{(264 - 0) \cdot 0.4343} \cong 3.8 \cdot 10^{-3} \ [\text{min}^{-1}]$$

$$\tau \cong 180 \ [\text{min}]$$

Versuch 27:

Tabelle 34: Zerfall des 6-Hydroxy-dihydrocytidins in ungepufferter Lösung bei 30° (Abb. 12)

c_o (Cytidin): $1.0 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 15 min;

E = 0.895 u_b = 45%

E_o = 0.878 u_h = 98%

t [min]	$E_o - E_t$	log $(E_o - E_t)$
0	0.386	0.586-1
15	0.359	0.555-1
30	0.330	0.519-1
45	0.309	0.490-1
60	0.288	0.461-1
75	0.268	0.428-1
90	0.249	0.396-1
105	0.239	0.378-1
120	0.223	0.348-1
135	0.206	0.314-1
150	0.199	0.299-1
165	0.187	0.272-1

$$k = \frac{0.579 - 0.270}{(160 - 0) \cdot 0.4343} \cong 4.4 \cdot 10^{-3} \ [\text{min}^{-1}]$$

$\tau \cong 150$ [min]

Versuch 28:

Tabelle 35: Zerfall des 6-Hydroxy-dihydrocytidins in gepufferter Lösung bei 20^{o} und pH 7.4 (Abb. 14)

Die Ausführung erfolgte wie in Versuch 23 beschrieben; Konzentration und Bestrahlungsdauer entnehme man der folgenden Tabelle;

c_o (Cytidin): $1.0 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 15 min;

$E = 0.880$ $u_b = 39\%$

$E_o = 0.872$ $u_h = 99\%$

t [min]	$E_o - E_t$	$\log (E_o - E_t)$
0	0.331	0.520-1
2	0.321	0.511-1
4	0.304	0.483-1
6	0.300	0.478-1
15	0.282	0.449-1
30	0.257	0.410-1
45	0.241	0.382-1
60	0.222	0.346-1
75	0.207	0.316-1
90	0.190	0.279-1
105	0.174	0.240-1
120	0.162	0.209-1
135	0.154	0.188-1
150	0.151	0.179-1
165	0.141	0.149-1
180	0.125	0.097-1

$$k = \frac{0.478 - 0.240}{(110 - 0) \cdot 0.4343} \cong 4.9 \cdot 10^{-3} \ [\text{min}^{-1}]$$

$$\tau \cong 140 \ [\text{min}]$$

Versuch 29:

Tabelle 36: Zerfall des 6-Hydroxy-dihydrocytidins in gepufferter Lösung bei 20° und pH 11.4

100 ml der Bestrahlungslösung wurden nach Beendigung der Bestrahlung mit 375.6 mg (1 mMol) $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ versetzt; pH der Lösung 11.4;

c_o (Cytidin): $0.81 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 15 min;

$E = 0.743$

$E_o = 0.880$

t [min]	$E_o - E_t$	log $(E_o - E_t)$
0	0.095	0.978-2
1	0.070	0.845-2
2	0.049	0.680-2
3	0.039	0.591-2
4	0.020	0.301-2
5	0.020	0.301-2
6	0.019	0.279-2
7	0.012	0.079-2
9	0.010	0.000-2
11	0.010	0.000-2

$$k = \frac{0.940 - 0}{(8.2 - 0) \cdot 0.4343} \cong 2.6 \cdot 10^{-1}\ [min^{-1}]$$

$$\tau \cong 3\ [min]$$

Versuch 30: Versuche zur Synthese des 6-Hydroxy-dihydrocytidins.

Eine Lösung von 40 mg (0.164 mMol) Cytidin in 10 ml wasser wurde, wie in Versuch 24 beschrieben, mit Bromwasser umgesetzt. Die Bromierungslösung wurde mit 0.4 g $BaCO_3$ und 0.5 g Raney-Nikkel versetzt, mit Wasser auf 150 ml verdünnt und 30 Minuten hydriert. Von der so erhaltenen filtrierten Lösung wurde eine kleine Menge im Verhältnis 1:10 verdünnt und zur kinetischen Messung verwandt; der Rest wurde auf 3 ml eingeengt und, wie in Versuch 24 beschrieben, chromatographiert. Es ergaben sich 3 Flecke: R_f 0.24; R_f 0.30; R_f 0.41;

Der R_f-Wert von 0.30 entspricht dem Cytidin, der von 0.41 dem Uracil-Ribosid. Die Substanz mit dem R_f-Wert von 0.24 konnte nicht identifiziert werden. Setzt man die papierchromatographisch gefundene Menge des Cytidins mit 100% an, so berechnet sich der Uridin-Gehalt zu 10%.

Versuch 31:

Tabelle 37: Zerfall der 6-Hydroxy-dihydrocytidin-2'(3')-phosphorsäure in ungepufferter Lösung bei 20° (Abb. 15)

c_o (Cytidylsäure): $0.97 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 25 min;

$E = 0.973$ $u_b = 42\%$

$E_o = 0.875$ $u_h = 90\%$

t [min]	$E_o - E_t$	$\log (E_o - E_t)$
0	0.315	0.498-1
30	0.245	0.389-1
45	0.236	0.373-1
60	0.224	0.350-1
75	0.212	0.326-1
90	0.199	0.299-1
150	0.165	0.217-1
180	0.149	0.173-1
210	0.135	0.130-1
240	0.124	0.094-1
270	0.111	0.045-1
300	0.097	0.987-2
330	0.089	0.949-2

$$k = \frac{1.434 - 0.940}{(336 - 0) \cdot 0.4343} \cong 3.4 \cdot 10^{-3} \ [\text{min}^{-1}]$$

$\tau \cong 200$ [min]

Versuch 32:

Tabelle 38: Zerfall der 6-Hydroxy-dihydrocytidin-2'(3')-phosphorsäure in ungepufferter Lösung bei 25° (Abb. 15)

c_o (Cytidylsäure): $1.0 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 30 min;

$E = 1.034$ $u_b = 43\%$

$E_o = 0.959$ $u_h = 93\%$

t [min]	$E_o - E_t$	$\log (E_o - E_t)$
0	0.338	0.529-1
15	0.303	0.481-1
30	0.278	0.444-1
45	0.254	0.414-1
60	0.243	0.386-1
75	0.228	0.358-1
90	0.210	0.322-1
105	0.199	0.299-1
120	0.182	0.260-1
135	0.176	0.246-1
150	0.164	0.215-1
165	0.159	0.201-1
180	0.141	0.149-1

$$k = \frac{0.500 - 0.200}{(155 - 0) \cdot 0.4343} \cong 4.4 \cdot 10^{-3} \ [\text{min}^{-1}]$$

$\tau = 150$ [min]

Versuch 33:

Tabelle 39: Zerfall der 6-Hydroxy-dihydrocytidin-2'(3')-phosphorsäure in ungepufferter Lösung bei 30° (Abb. 15)

c_o (Cytidylsäure): $1.7 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 35 min;

$E = 1.671$ $u_b = 34\%$

$E_o = 1.520$ $u_h = 91\%$

t [min]	$E_o - E_t$	$\log (E_o - E_t)$
0	0.414	0.617-1
15	0.337	0.528-1
30	0.281	0.449-1
45	0.267	0.426-1
60	0.215	0.333-1
75	0.174	0.241-1
90	0.168	0.225-1
105	0.156	0.193-1
120	0.130	0.114-1
135	0.112	0.049-1
150	0.101	0.004-1
165	0.097	0.987-2
180	0.082	0.914-2
195	0.068	0.833-2

$$k = \frac{1.578 - 0.840}{(196 - 0) \cdot 0.4343} \cong 8.7 \cdot 10^{-3} \ [\text{min}^{-1}]$$

$$\tau \cong 80 \ [\text{min}]$$

Versuch 34:

Tabelle 40: Zerfall der 6-Hydroxy-dihydrocytidin-2'(3')-phosphorsäure in gepufferter Lösung bei 20° und pH 7.4 (Abb. 16)

Die Ausführung erfolgte wie in Versuch 23 beschrieben; Konzentration und Bestrahlungsdauer entnehme man der folgenden Tabelle;

c_o (Cytidylsäure): $1.0 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 25 min;

$E = 1.000$ $u_b = 46\%$

$E_o = 0.883$ $u_h = 88\%$

t [min]	$E_o - E_t$	$\log (E_o - E_t)$
0	0.340	0.532-1
1	0.338	0.529-1
2	0.338	0.529-1
10	0.333	0.522-1
20	0.318	0.502-1
30	0.311	0.493-1
40	0.295	0.470-1
60	0.283	0.452-1
140	0.248	0.394-1
150	0.243	0.386-1
180	0.229	0.360-1
210	0.215	0.333-1
240	0.205	0.312-1
270	0.193	0.286-1
300	0.184	0.265-1
330	0.172	0.235-1

$$k = \frac{0.507 - 0.250}{(317 - 0) \cdot 0.4343} \cong 1.9 \cdot 10^{-3} \ [\text{min}^{-1}]$$

$$\tau \cong 372 \ [\text{min}]$$

Versuch 35:

Tabelle 41: Zerfall der 6-Hydroxy-dihydrocytidin-2'(3')-phosphorsäure in gepufferter Lösung bei 20° und pH 7.4 (Abb. 16)

100 ml der Bestrahlungslösung wurden nach Beendigung der Bestrahlung mit 312 mg (1 mMol) $Na_2HAsO_4 \cdot 7\ H_2O$ versetzt;

c_o (Cytidylsäure): $0.98 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 25 min;

$E = 0.982$ $u_b = 41\%$

$E_o = 0.895$ $u_h = 91\%$

t [min]	$E_o - E_t$	$\log (E_o - E_t)$
0	0.317	0.501-1
1	0.315	0.498-1
3	0.312	0.494-1
10	0.305	0.484-1
15	0.303	0.481-1
30	0.292	0.465-1
90	0.255	0.406-1
120	0.246	0.391-1
150	0.230	0.362-1
180	0.224	0.350-1
210	0.207	0.316-1
240	0.195	0.290-1
270	0.200	0.301-1
300	0.179	0.253-1
330	0.185	0.267-1

$$k = \frac{0.487 - 0.250}{(300 - 0) \cdot 0.4343} \cong 1.8 \cdot 10^{-3}\ [\text{min}^{-1}]$$

$$\tau \cong 381\ [\text{min}]$$

Versuch 36:

Tabelle 42: Zerfall der 6-Hydroxy-dihydrocytidin-2'(3')-phosphorsäure in $6 \cdot 10^{-2}$ m NaCl-Lösung bei 20^{o} (Abb. 17)

100 ml der Bestrahlungslösung wurden nach Beendigung der Bestrahlung mit 360 mg (6 mMol) NaCl versetzt;

c_o (Cytidylsäure): $1.0 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 25 min;

$E = 1.029$ $u_b = 42\%$

$E_o = 0.875$ $u_h = 85\%$

t [min]	$E_o - E_t$	$\log (E_o - E_t)$
0	0.273	0.436-1
2	0.265	0.423-1
4	0.264	0.422-1
6	0.256	0.408-1
10	0.254	0.405-1
15	0.243	0.385-1
30	0.229	0.360-1
90	0.175	0.243-1
120	0.165	0.218-1
150	0.145	0.161-1
180	0.135	0.130-1
210	0.120	0.079-1
240	0.105	0.021-1
270	0.096	0.982-2
300	0.086	0.934-2
330	0.075	0.875-2
360	0.067	0.825-2

$$k = \frac{1.400 - 0.920}{(305 - 0) \cdot 0.4343} \cong 3.6 \cdot 10^{-3} \ [\text{min}^{-1}]$$

$$\tau \cong 190 \ [\text{min}]$$

Versuch 37:

Tabelle 43: Zerfall der 6-Hydroxy-dihydrocytidin-2'(3')-phosphorsäure in $3 \cdot 10^{-2}$ m Na_2SO_4-Lösung bei 20° (Abb. 17)

100 ml der Bestrahlungslösung wurden nach Beendigung der Bestrahlung mit 960 mg (3 mMol) Na_2SO_4 versetzt;

c_o (Cytidylsäure): $0.99 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 25 min;

$E = 0.995$ $u_b = 42\%$

$E_o = 0.870$ $u_h = 88\%$

t [min]	$E_o - E_t$	$\log (E_o - E_t)$
0	0.287	0.458-1
2	0.279	0.446-1
4	0.270	0.432-1
6	0.266	0.425-1
30	0.223	0.348-1
45	0.205	0.321-1
60	0.180	0.255-1
90	0.162	0.204-1
120	0.138	0.140-1
180	0.089	0.949-2
210	0.078	0.892-2
240	0.065	0.813-2
270	0.058	0.763-2
300	0.046	0.663-2
330	0.030	0.477-2
360	0.030	0.477-2

$$k = \frac{1.416 - 0.562}{(340 - 0) \cdot 0.4343} \cong 5.8 \cdot 10^{-3} \ [\text{min}^{-1}]$$

$$\tau \cong 120 \ [\text{min}]$$

Versuch 38:

Tabelle 44: Zerfall der 6-Hydroxy-dihydrocytidin-2'(3')-phosphorsäure in alkalischer Lösung bei 20°; pH der Lösung 11.4 (Abb. 18)

100 ml der Bestrahlungslösung wurden nach Beendigung der Bestrahlung mit 40 mg (1 mMol) NaOH unter Kühlung versetzt;

c_o (Cytidylsäure): $1.1 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 40 min;

E = 1.104 u_h = 96%

E_o = 0.900

t [min]	$E_o - E_t$	log $(E_o - E_t)$
0	0.220	0.342-1
1	0.190	0.279-1
2	0.169	0.228-1
3	0.150	0.176-1
4	0.125	0.097-1
5	0.104	0.017-1
6	0.100	0.000-1
7	0.093	0.968-2
9	0.076	0.881-2
11	0.054	0.771-2
13	0.052	0.715-2
18	0.034	0.542-2
22	0.028	0.447-2
27	0.024	0.380-2

$$k = \frac{1.320 - 0.380}{(18.8 - 0) \cdot 0.4343} \cong 1.15 \cdot 10^{-1} \ [\text{min}^{-1}]$$

$\tau \cong 6$ [min]

Versuch 39:

Tabelle 45: Zerfall der 6-Hydroxy-dihydrocytidin-2'(3')-phosphorsäure in alkalischer Lösung bei 20°; pH der Lösung 11.4 (Abb. 18)

Die Ausführung erfolgte wie in Versuch 29 beschrieben; Konzentration und Bestrahlungsdauer entnehme man der folgenden Tabelle;

c_o (Cytidylsäure): $0.98 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 25 min;

$E = 0.975$ $u_h = 90\%$

$E_o = 0.880$

t [min]	$E_o - E_t$	log $(E_o - E_t)$
0	0.193	0.286-1
1	0.171	0.233-1
2	0.159	0.201-1
3	0.145	0.161-1
4	0.126	0.100-1
5	0.109	0.037-1
6	0.100	0.000-1
7	0.090	0.954-2
8	0.090	0.954-2
9	0.080	0.903-2
11	0.070	0.845-2
13	0.055	0.741-2
15	0.050	0.699-2
17	0.040	0.602-2
19	0.038	0.580-2
22	0.030	0.477-2
25	0.020	0.301-2
28	0.020	0.301-2

$$k = \frac{1.244 - 0.300}{(25.5 - 0) \cdot 0.4343} \cong 8.5 \cdot 10^{-2} \ [\text{min}^{-1}]$$

$$\tau \cong 8 \ [\text{min}]$$

Versuch 40: Darstellung der 6-Hydroxy-dihydrocytidin-2'(3')-phosphorsäure durch hydrierende Debromierung.

16.2 mg (0.05 mMol) Cytidylsäure wurden, wie in Versuch 24 beschrieben, bromiert und anschließend unter Zugabe von 0.4 g $BaCO_3$ und 0.3 g Raney-Nickel 18 Minuten hydriert. Von der nach dem Abfiltrieren des $BaCO_3$ und Raney-Nickels verbleibenden Lösung wurde eine kleine Probe entnommen, auf 1:10 verdünnt und zur kinetischen Untersuchung verwandt. Wir erhielten eine RGK I. Ordnung von $1.5 \cdot 10^{-2}$ $[min^{-1}]$ und eine Halbwertszeit von 45 Minuten.

Versuch 41: Isolierung der 6-Hydroxy-dihydrocytidin-2'(3')-phosphorsäure.

16.2 mg (0.05 mMol) Cytidylsäure, gelöst in 10 ml Wasser, wurden mit ca. 0.05 mMol Br_2 als wässrige Lösung versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden zur Bromierungslösung 71 mg (0.5 mMol) Na_2HPO_4 sowie 0.5 g Raney-Nikkel und 0.5 g $BaCO_3$ gegeben. Nach 15 Minuten Hydrierung bei Normaldruck wurden von der filtrierten Lösung je 0.03 ml auf Platten von Polyäthylen-imin-Cellulose (0.5 mm Schichtdicke) aufgetragen, mit einem kalten Luftstrom getrocknet und bei 0^oC mit 0.6 m NaCl-Lösung 3 Stunden entwickelt.

Ergebnis: Siehe Abbildung 19, Seite 58 .

Versuch 42: Photochemische Darstellung der 6-Hydroxy-dihydro-cytidin-2'(3')-phosphorsäure.

35 ml einer 10^{-3} m Lösung von Cytidylsäure in 10^{-2} m Na_2HPO_4-Lösung (pH der Lösung 7.4) wurden mit einem Niederdruckbrenner (NK 25/7 mit KBr-Filter) bis zu einer 40-proz. Abnahme der Extinktion bei 270 nm (Bestrahlungsdauer: 60 min) bestrahlt. Die Reversibilität der so erhaltenen Lösung betrug 94%. Sofort nach Beendigung der Bestrahlung wurden je 0.03 ml in der in Versuch 41 beschriebenen weise chromatographiert. Es ergaben sich 2 Flecke:
R_f 0.35, nicht umgesetzte Cytidylsäure;
R_f 0.39, ein Fleck, der sich beim Eluieren als Cytidylsäure erwies. Mol. Mengenverhältnis ca. 4:1 .

Ergebnis: Siehe Abbildung 19, Seite 58 .

Versuch 43: Untersuchung der bei der UV-Bestrahlung von Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure anfallenden Nebenprodukte.

a) Cytosin in wässriger Lösung:

70 ml einer 10^{-4} m wässrigen Cytosinlösung wurden mit dem Niederdruckbrenner NK 25/7 (KBr-Filter) 80 Minuten bestrahlt (Abnahme der Extinktion um 40%). Die Lösung wurde auf wenige ml eingeengt und 0.1 ml chromatographiert. System: n-Propanol/n-Butanol/Wasser (1:1:1) absteigend.
Wir erhielten 3 Flecke: R_f 0.53 (Uracil); R_f 0.41 (Cytosin); R_f 0.35 (unbekannte Substanz). Uracil und Cytosin wurden im molaren Verhältnis 1:12 gefunden.

b) Cytidin in wässriger Lösung:

35 ml einer 10^{-4} m wässrigen Cytidinlösung wurden wie unter a) beschrieben bestrahlt (Bestrahlungsdauer: 30 min; Abnahme der

Extinktion um 78%). Die wie oben ausgeführte Papierchromatographie lieferte nur 2 Flecke: R_f 0.40 (Uridin) und R_f 0.30 (Cytidin). Uridin und Cytidin wurden im molaren Verhältnis 1:10 gefunden.

c) Cytidylsäure in wässriger Lösung:

35 ml einer 10^{-4} m wässrigen Cytidylsäurelösung wurden in gleicher weise wie in a) beschrieben bestrahlt (Bestrahlungsdauer: 45 min; Abnahme der Extinktion um 63%). Die Chromatographie der eingeengten Lösung im System i-Propanol/2 n HCl aufsteigend, lieferte nur den Fleck der Cytidylsäure (R_f 0.59).

0.1 ml der obigen Lösung wurden im System n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) aufsteigend chromatographiert. Nach dem Besprühen mit einer Anilinphtalat-Lösung ergab sich mit R_f 0.18 ein rötlicher Fleck, der als abgespaltenes Ribosephosphat identifiziert wurde.

Versuch 44a: Die UV-Bestrahlung von Thymin in wässriger Lösung.

35 ml einer 10^{-4} m wässrigen Thyminlösung wurden mit dem Brenner NK 25/7 (KBr-Filter) bestrahlt, bis eine Abnahme der Extinktion bei 265 nm von 5.2% eingetreten war (Bestrahlungsdauer: 45 min). Beim Stehenlassen stieg die Extinktion um 4.5% an.

Versuch 44b: Die UV-Bestrahlung von Thymidin in wässriger Lösung.

35 ml einer $0.5 \cdot 10^{-4}$ m wässrigen Thymidinlösung wurden in analoger Weise bestrahlt (Bestrahlungsdauer: 80 min); Abnahme der Extinktion bei 272 nm: 10.5%. Beim Stehenlassen der Lösung stieg die Extinktion um 3.5% auf 93% an.

Versuch 45: Bestrahlung von 1-Methyl-cytosin in wässriger Lösung.

Tabelle 46: Zerfall des 1-Methyl-6-hydroxy-dihydrocytosins in ungepufferter Lösung bei 20^{o} (Abb. 20)

c_o (1-Methyl-cytosin): $0.88 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 50 min;

$E = 0.721$ $u_b = 18\%$

$E_o = 0.680$ $u_h = 95\%$

t [min]	$E_o - E_t$	$\log (E_o - E_t)$
0	0.080	0.903-2
10	0.071	0.852-2
20	0.069	0.835-2
30	0.066	0.819-2
45	0.061	0.785-2
60	0.053	0.724-2
75	0.050	0.699-2
105	0.040	0.602-2
120	0.036	0.556-2
135	0.030	0.477-2
150	0.030	0.477-2
165	0.026	0.415-2
180	0.021	0.322-2
195	0.020	0.301-2
210	0.015	0.176-2

$$k = \frac{0.925 - 0.250}{(211 - 0) \cdot 0.4343} \cong 7.4 \cdot 10^{-3} \ [\text{min}^{-1}]$$

$$\tau \cong 94 \ [\text{min}]$$

Tabelle 47: Zerfall des 1-Methyl-6-hydroxy-dihydrocytosins in ungepufferter Lösung bei 25° (Abb. 20)

c_o (1-Methyl-cytosin): $0.89 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 50 min;

$E = 0.725$ $u_b = 15\%$

$E_o = 0.685$ $u_h = 95\%$

t [min]	$E_o - E_t$	$\log (E_o - E_t)$
0	0.067	0.826-2
20	0.059	0.771-2
30	0.053	0.724-2
42	0.047	0.672-2
51	0.044	0.644-2
65	0.040	0.602-2
80	0.036	0.556-2
95	0.034	0.531-2
111	0.024	0.380-2
125	0.023	0.362-2
140	0.022	0.342-2
167	0.015	0.176-2
200	0.014	0.146-2

$$k = \frac{0.850 - 0}{(212 - 0) \cdot 0.4343} \cong 9.3 \cdot 10^{-3} \ [\text{min}^{-1}]$$

$$\tau \cong 75 \ [\text{min}]$$

Tabelle 48: Zerfall des 1-Methyl-6-hydroxy-dihydrocytosins in ungepufferter Lösung bei 30° (Abb. 20)

c_o (1-Methyl-cytosin): $0.88 \cdot 10^{-4}$ m; Bestrahlungsdauer: 50 min;

$E = 0.720$ $u_b = 18\%$

$E_o = 0.699$ $u_h = 97\%$

t [min]	$E_o - E_t$	log $(E_o - E_t)$
0	0.101	1.004-2
10	0.089	0.950-2
15	0.084	0.925-2
20	0.080	0.904-2
25	0.074	0.870-2
30	0.070	0.846-2
35	0.068	0.833-2
40	0.060	0.729-2
45	0.058	0.764-2
50	0.054	0.733-2
55	0.051	0.708-2
60	0.049	0.690-2
70	0.041	0.613-2
105	0.029	0.462-2
120	0.023	0.362-2
135	0.019	0.279-2
150	0.019	0.279-2

$$k = \frac{1.005 - 0.200}{(150 - 0) \cdot 0.4343} \cong 18.6 \cdot 10^{-3} \ [\text{min}^{-1}]$$

$\tau \cong 37$ [min]

Versuch 46: Untersuchung der bei der UV-Bestrahlung von 1-Methyl-cytosin entstehenden Produkte.

35 ml einer 10^{-4} m wässrigen 1-Methyl-cytosinlösung wurden mit dem Brenner NK 25/7 (KBr-Filter) 180 Minuten bestrahlt (Abnahme der Extinktion um 60%). Die Lösung wurde auf 1 ml eingeengt und 0.05 ml chromatographiert; Papierchromatographie: n-Propanol/n-Butanol/Wasser (1:1:1) absteigend. Wir erhielten 2 Flecke: R_f 0.41 (1-Methyl-cytosin), R_f 0.51 (1-Methyl-uracil).

Versuch 47: UV-Bestrahlung von i-Cytosin und 5-Methyl-i-cytosin in wässriger Lösung.

a) 35 ml einer 10^{-4} m wässrigen i-Cytosinlösung wurden 45 Minuten mit dem Brenner NK 25/7 (KBr-Filter) bestrahlt (Abnahme der Extinktion um 34%). Die Lösung zeigte beim Stehenlassen oder Erwärmen auf 80° keinerlei Reversibilität.

b) 35 ml einer 10^{-4} m wässrigen 5-Methyl-i-cytosinlösung wurden in gleicher Weise bestrahlt (Bestrahlungsdauer: 60 min; Abnahme der Extinktion um 17%). Die Lösung zeigte keinerlei Reversibilität.

Versuch 48: Die UV-Bestrahlung von Cytosin, Cytidin und Cytidin-2'(3')-phosphorsäure in gefrorener wässriger Lösung.

In einer offenen Petri-schale wurden jeweils 7 ml der oben angegebenen Pyrimidine mit dem Brenner NN 15/44 in 10^{-2} m gefrorener Lösung bestrahlt. Bestrahlungsdauer und Abnahme der Extinktion entnehme man Tabelle 22, Seite 67.

Dimere konnten nicht nachgewiesen werden.

Versuch 49: UV-Bestrahlung von 1-Methyl- und 5-Methyl-cytosin sowie von 5-Amino-uracil in gefrorener wässriger Lösung.

a) 1-Methyl-cytosin:

25 ml einer $4 \cdot 10^{-2}$ m Lösung von 1-Methyl-cytosin wurden 9 Stunden in der in Versuch 48 beschriebenen Apparatur bestrahlt. Die Abnahme der Extinktion betrug 10%. Die Chromatographie im System n-Propanol/n-Butanol/Wasser (1:1:1) ergab nur 1-Methyl-cytosin (R_f 0.42).

b) 5-Methyl-cytosin:

7 ml einer 10^{-2} m gefrorenen wässrigen 5-Methyl-cytosinlösung wurden wie bei a) beschrieben 1 Stunde bestrahlt; Abnahme der Extinktion: 15%. Die Bestrahlung der aufgetauten Lösung 3 Minuten mit dem Brenner NK 6/20 (ohne Filter) ergab keinen Anstieg der Extinktion.

c) 5-Amino-uracil:

20 ml einer 10^{-3} m gefrorenen wässrigen 5-Amino-uracillösung wurden wie unter a) beschrieben 1 Stunde bestrahlt; Abnahme der Extinktion: 18%. Die Behandlung der Lösung mit dem Brenner NK 6/20 (ohne Filter) lieferte einen Anstieg der Extinktion von 4%, so daß die Bildung eines Dimeren in geringer Ausbeute anzunehmen ist.

Versuch 50: Die UV-Bestrahlung von Adenin, Adenosin und Adenylsäure in wässriger Lösung.

a) Adenin:

50 ml einer wässrigen $2.2 \cdot 10^{-3}$ m Adeninlösung wurden 15 Stunden mit dem Niederdruckbrenner NN 15/44 in einer offenen Schale bestrahlt. Die Abnahme der Extinktion der mit Wasser auf 50 ml aufgefüllten Lösung betrug 4%. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer auf wenige ml eingeengt und papierchromatographiert. Es wurden 0.1 ml im System 5% Na_2HPO_4/i-Amylol (2:1) absteigend entwickelt. Nachgewiesen wurde nur der Fleck des Adenins (R_f 0.44).

b) Adenosin:

50 ml einer $1.2 \cdot 10^{-3}$ m Adenosinlösung wurden in analoger Weise bestrahlt. Durch Chromatographie der eingeengten Lösung im gleichen System konnten 80% der eingesetzten Adenosinmenge (R_f 0.56) nachgewiesen werden. Die Extinktionsabnahme betrug 16%. Bestrahlungsprodukte konnten nicht identifiziert werden.

c) Adenylsäure:

50 ml einer $2.0 \cdot 10^{-3}$ m Adenylsäurelösung wurden wie oben beschrieben bestrahlt (Abnahme der Extinktion: 10%). Die Chromatographie von 0.1 ml der eingeengten Lösung ergab im gleichen System wie bei a) und b) 1% Adenin (R_f 0.44) und Adenylsäure (R_f 0.68).

Versuch 51: Die UV-Bestrahlung von Guanosin und Guanylsäure in wässriger Lösung.

a) Guanosin:

35 ml einer $0.6 \cdot 10^{-4}$ m wässrigen Guanosinlösung wurden mit dem Brenner NK 25/7 (ohne Filter) 6 Stunden bestrahlt (Abnahme der Extinktion: 25%). Beim Stehen wurde keinerlei Reversibilität be-

obachtet. Papierchromatographisch (System: n-Butanol/Wasser$_{ges.}$) konnten nur Guanosin und Guanin nachgewiesen werden.

b) Guanylsäure:

10 ml einer $1.3 \cdot 10^{-4}$ m Guanylsäurelösung wurden 15 Stunden in offener Schale mit dem Brenner 15/44 (ohne Filter) bestrahlt (Abnahme der Extinktion: 22%). Die Papierchromatographie lieferte 50% der eingesetzten Menge Guanylsäure (R_f 0.65) und 17% Guanosin (R_f 0.40).

III. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1) Zusammenfassender Artikel:
H.DRUCKREY, Z.f.Krebsforschung 66, 138 (1964)

2) H.DRUCKREY, Naturwissenschaften 48, 134 (1961)

3) H.DRUCKREY, Naturwissenschaften 50, 100 (1963)

4) D.SCHMAHL und C.THOMAS, Z.f.Krebsforschung 66, 125 (1964)

5) D.F.HEATH, Nature (London) 192, 170 (1961)

6) P.N.MAGEE und E.FARBER, Biochem.J. 83, 114 (1962)

7) E.MÜLLER, Chem.Ber. 96, 570 (1963)

8) A.GEUTHER, Liebigs Ann.Chem. 128, 151 (1863)

9) E.FAHR, unveröffentlicht

10) G.ROTH, Diplomarbeit Univ. Würzburg (1964)

11) B.A.PORAI-KOSHITS, Reaktsionnaya Sposobuost Organ.Soedin., Tartusk.Gos.Univ. 1 (2), 10 (1964); [C.A. 62, 7606e (1965)]

12) R.ZAHRADNIK, Czechoslov.Chem.Commun. 23, 1529 (1958)

13) A.KOSSEL und H.STEUDEL, Z.physiol.Chem. 38, 49 (1903)

14) D.W.WILSON, J.biol.Chem. 56, 183 (1923)

15) H.SCHUSTER und G.SCHRAMM, Z.Naturf. 13b, 697 (1958)

16) E.LOCHMANN und W.STEIN, Z.Naturf. 18b, 809 (1963)

17) A.R.TODD, J.chem.Soc. [London] 1944, 315

18) G.DÖRHÖFER, Dissertation Univ. Würzburg (1966)

19) J.ELKS und D.H.HEY, J.chem.Soc. [London] 1943, 441

20) H.SCHUSTER und R.C.WILHELM, Biochim.et Biophys.Acta 68, 554 (1963)

21) R.SHAPIRO, J.Amer.chem.Soc. 86, 2948 (1964)

22) A.M.MOORE, Can.J.Chem. 41, 1937 (1963)

23) R.L.SINSHEIMER und R.HASTINGS, Science (New York) 110, 525 (1949); [C.A. 44, 1810 (1950)]

24) A.M.MOORE, Science (Washington) 122, 594 (1955)

25) S.Y.WANG, J.Amer.chem.Soc. 80, 6199 (1958)

26) H.GATTNER und E.FAHR, Liebigs Ann.Chem. 670, 84 (1963)

27) S.Y.WANG, J.Amer.chem.Soc. 78, 4180 (1956)

28) D.SHUGAR und K.L.WIERZCHOWSKI, a) Biochim.et Biophys.Acta 23, 657 (1957); b) Acta biochim.polon. 7, 377 (1960); c) J.Polymer Sci. 31, 269 (1958); [C.A. 53, 65 (1959)]; d) Proc.Intern.Congr.Photobiol. 3rd, Copenhagen, 1960, 606; [C.A. 58, 9783 (1963)]

29) R.BEUKERS und W.BERENDS, a) Recueil Trav.chim.Pays-Bas 77, 423 (1958); b) Recueil Trav.chim.Pays-Bas 77, 729 (1958); c) Biochim.et Biophys.Acta 41, 550 (1960); d) L.GROSSMAN, J.ONO und R.G.WILSON, Feder.Proc. 24, 80 (1965)

30) J.ONO, R.G.WILSON und L.GROSSMAN, J.Mol.Biol. 11, 600 (1965)

31) C.HELENE und P.DOUZOU, C.R.hebd.Seances Acad.Sci. 258, 196 (1964)

32) A.WACKER in "Progress in Nucleic Acid Research", Vol.I, S.369, Academic Press Inc. New York 1963

33) S.Y.WANG, Nature (London) 184, 184 (1959)

34) D.SHUGAR und K.L.WIERZCHOWSKI, Biochim.et Biophys.Acta 25, 355 (1957)

35) A.WACKER, Angew.Chem. 73, 64 (1961)

36) H.GATTNER und E.FAHR, Z.Naturf. 19b, 74 (1964)

37) G.HILBERT und F.JANSEN, J.Amer.chem.Soc. 56, 134 (1934)

38) H.L.WHEELER und T.B.JOHNSON, J.biol.Chem. 3, 183 (1906)

39) K.L.WIERZCHOWSKI und D.SHUGAR, Acta biochim.polon. 8, 219 (1961); [C.A. 56, 15799 (1961)]

40) R.L.SINSHEIMER, Radiation Research 6, 121 (1957); [C.A. 51, 7160 (1957)]

41) H.E.JOHNS, J.C.LEBLANC und K.B.FREEMAN, J.Mol.Biol. 13, 849 (1965)

42) K.W.BRAMMER, Biochim.et Biophys.Acta 72, 217 (1963)

43) H.SCHUSTER, Z.Naturf. 19b, 815 (1964)

44) D.WEINBLUM, Dissertation TU Berlin 1961

45) M.DANIELS und A.GRIMISON, Biochim.et Biophys.Res.Comm. 16, 428 (1964)

46) C.NOFRE und A.CIER, Bull.Soc.chim.France 1966, 1326

47) G.HILBERT, J.Amer.chem.Soc. 56, 190 (1934)

48) D.SHUGAR in E.CHARGAFF und J.N.DAVIDSON, "The Nucleic Acids", Bd.3, S.63, Academic Press Inc. New York 1960

49) D.SHUGAR in E.CHARGAFF und J.N.DAVIDSON, "The Nucleic Acids", Bd.3, S.49, Academic Press Inc. New York 1960

50) D.SHUGAR und J.J.FOX, Biochim.et Biophys.Acta 9, 206 (1952)

51) G.D.DOROUGH und D.L.SEATON, J.Amer.chem.Soc. 76, 2873 (1954)

52) W.WILSON, J.chem.Soc. [London] 1948, 1159

53) J.M.PLOESER und H.S.LORING, J.biol.Chem. 178, 435 (1949)

54) D.SHUGAR und J.J.FOX, Biochim.et Biophys.Acta 9, 375 (1952)

55) J.M.PLOESER und H.S.LORING, J.biol.Chem. 178, 431 (1949)

56) H.SCHUSTER, Z.Naturf. 13b, 699 (1958)

57) M.J.KAMLET, "Organic Electronic Spectral Data I", Interscience Publishers, Inc. New York

58) PABST LABORATORIES, Firmenmitteilung

59) H.HATT, Org.Synth. 16, 22 (1936)

60) D.F.HEATH und A.R.MATTOCKS, J.chem.Soc. [London] 1961, 4226

61) A.J.VOGEL, Practical Organic Chemistry, Seite 547 (1948)

62) A.J.VOGEL, Practical Organic Chemistry, Seite 417 (1948)

63) L.KNORR, Liebigs Ann.Chem. 221, 298 (1883)

64) D.M.BROWN und A.TODD, J.chem.Soc. [London] 1956, 2384

Lebenslauf

Am 5. Juni 1937 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Alfons Kleber und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Kempf, in Würzburg geboren. Hier besuchte ich ab September 1943 die Volksschule und trat dann im September 1948 in die Oberrealschule Würzburg ein. Dort legte ich im September 1957 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1957 schrieb ich mich an der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg für das Fach Chemie ein. Im Januar 1961 legte ich die Diplom-Vorprüfung und im November 1963 die Diplom-Hauptprüfung ab. Meine Diplomarbeit wurde am 25. Januar 1965 angenommen.

Am 20. Februar 1965 heiratete ich die Bauzeichnerin Gisela Wirl. Seit dem 1. Februar 1965 bin ich Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle.

Ich habe mich noch an keiner anderen Fakultät um den Doktorgrad beworben.

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. E.Fahr vom Dezember 1963 bis Juli 1966 an der Universität Würzburg.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

Bergmann, Briegleb, Brieskorn, Diergarten, Fahr, Fischer, Hahn, Hartmann, Hünig, Kulenkampf, Roedig, Scheer, Weiß.

BAMBERGER FOTODRUCK - Rudolf Rodenbusch